

INDICE

Introduzione.....	4
CAPITOLO 1.....	7
1.1. Le acque destinate all'irrigazione: aspetti normativi e sanitari.....	7
1.1.1. Le acque sotterranee	7
1.1.2. Gli aspetti normativi	9
1.1.3. Gli aspetti sanitari.....	12
1.1.4. La scelta degli indicatori	14
1.1.5. I sistemi di potabilizzazione delle acque.....	16
1.2. L'inquadramento geografico	18
1.3. Prodotti vegetali: aspetti sanitari e normativi.....	21
1.4. Prodotti vegetali di IV gamma	22
1.5. La PCR nella microbiologia ambientale e alimentare	24
CAPITOLO 2	26
2.1. Scopo del lavoro	26
2.2. Organizzazione del lavoro	27
2.3. Identificazione dei siti di campionamento	29
2.4. Materiali e metodi.....	32
2.4.1. Acqua	32
2.4.2. Alimenti	34
2.4.3. Indagini cliniche.....	35
2.4.4. PCR.....	36
CAPITOLO 3.....	39
3.1. Risultati e discussione dei risultati	39
3.1.1. Matrice acqua – Sorgente S1 (lavatoio comunale)	39
3.1.2. Matrice acqua – Sorgente S2 (acqua d'alice)	40
3.1.3. Matrice acqua – Sorgente S3 (peschiera)	41
3.1.4. Matrice acqua – Sinottico	42
3.1.5. Alimenti	44
3.1.6. Indagini cliniche.....	46
3.1.7. PCR.....	47

CAPITOLO 4	50
4.1. Conclusioni e strategie di prevenzione	50
Bibliografia.....	53
Appendice.....	65

Introduzione

Negli ultimi anni nella nostra società è emerso con importanza sempre maggiore il problema dell'utilizzazione razionale delle risorse idriche in seguito alla loro carenza (Bonadonna L. et al. 2007; UN, 2006; EEA, 1999). In molte aree il degrado qualitativo delle acque interne ha raggiunto livelli tali da rappresentare un fattore limitante per la loro utilizzazione, con gravi conseguenze sulle attività umane e produttive (Picchi A. et al. 2004). In particolare le conseguenze dell'inquinamento delle acque sul settore agricolo sono risultati gravi e di rilevanti dimensioni. In taluni casi, alla scarsa disponibilità di risorse idriche si accompagna il loro degrado qualitativo, causato da fenomeni di inquinamento sia puntuali che diffusi (sversamento di acque reflue civili e industriali, incremento della salinità delle acque per eccessivo emungimento, ecc.). Nei casi più eclatanti (Bacino del Sarno (Guida M. et al., 2007) Puglia, Sicilia, Sardegna ecc.), si osservano vere e proprie situazioni di emergenza, la cui soluzione richiede interventi appropriati, da attuare sulla base delle indicazioni che scaturiscono da una approfondita e dettagliata indagine che riguardi sia le opere idrauliche (strutture di captazione, adduzione e distribuzione) sia la qualità dell'acqua captata e distribuita (INEA, 2000).

La risoluzione del problema va a snodarsi su due linee: la qualità e la disponibilità. Secondo gli indicatori di pressione proposti dall'OCSE, l'Italia ha, sotto molti aspetti, la maglia nera della UE; ciò è valido anche per quanto riguarda l'agricoltura. Siamo uno dei Paesi che consumano la più alta quantità d'acqua per ettaro irrigato. Recenti stime indicano in 20 miliardi di m³ i prelievi annui solo per uso irriguo. Dopo il Canada e gli Stati Uniti, l'Italia è il terzo Paese al mondo e il primo in Europa nella classifica dei maggiori consumatori d'acqua, con un consumo annuo pari a 1.200 metri cubi annui/persona (UN, 2006). In Italia, nel 1994, la cosiddetta "Legge Galli" ha sancito ufficialmente la proprietà pubblica di tutte le acque superficiali e sotterranee del Paese e la priorità del consumo umano rispetto agli altri usi. Ogni anno in Italia viene erogata una quantità di acqua potabile pari a circa 8 miliardi di metri cubi. L'alimentazione del sistema

acquedottistico avviene per l'86% da acque sotterranee e per il 14% da acque superficiali (Bonadonna L. et al. 2007).

Poiché l'agricoltura e l'industria sono i settori che più assorbono in termini di consumo idrico, è soprattutto in questi ambiti che occorre intervenire. Il miglioramento delle tecniche d'irrigazione e l'introduzione di tecniche di ricircolo negli usi industriali, con il riutilizzo di acque reflue adeguatamente trattate, potrebbero contribuire a ridurre i consumi e il depauperamento delle risorse.

In tale congiuntura è sempre più evidente la necessità di un approccio globale nello studio della qualità di acque superficiali e profonde, più o meno esposte a fenomeni di contaminazione ambientale o di inquinamento antropico. La loro qualità variabile ha un costo economico per una comunità e influisce sulle potenzialità d'uso. Le acque inquinate in genere, e quelle reflue in particolare, devono essere considerate, sia per i rischi sanitari cui possono soggiacere le persone che vengano in contatto con esse, sia per i problemi ecologici connessi alla contaminazione ambientale e dei corpi idrici ricettori (Aulicino A. et al., 2004).

Il problema igienico-sanitario legato a questo tipo di sfruttamento dell'acqua è molto delicato. Indagini recenti in diversi comprensori hanno evidenziato che la qualità delle acque di molti fiumi e torrenti è tale da imporre limitazioni nel loro impiego per l'irrigazione (Ficco P. et al, 1999). Le acque, infatti, possono veicolare sostanze tossiche ed organismi patogeni per l'uomo e per gli animali. (Carraro E et al, 2004, Gale P et al., 2001, Leclerc H, 2003, O'Brien AD et al., 2002). Alcuni inquinanti si presentano, da questo punto di vista, molto pericolosi in quanto tendono ad accumularsi nei prodotti vegetali, a cui è destinata, senza manifestazioni di tossicità da parte della pianta (Doller PC et al, 2002). Inoltre il crescente aumento della domanda da parte dei consumatori di ortaggi freschi/minimamente lavorati e l'incremento dell'importazione di prodotti vegetali freschi da Paesi dove gli standard di igiene possono essere compromessi, ha aumentato l'interesse sulle epidemie di gastroenteriti nell'uomo che possono essere associate con il consumo di determinati prodotti alimentari. Negli ultimi anni è in aumento il numero di

episodi epidemici di infezioni umane associate al consumo di frutta e ortaggi crudi e succhi di frutta non pastorizzati (Delaquis P. et al., 2007; Tyrrel SF., et al., 2006; Steele M. et al., 2005; Steele et al., 2004; Stine SW. et al., 2005; McMahon MAS et al., 2001). Infatti la presenza di organismi patogeni nelle acque irrigue non esercita azioni limitanti sull'attività vegetativa né sulla fertilità del terreno, ma pone serie preoccupazioni sotto l'aspetto igienico-sanitario. Il rischio consiste nella possibilità di contagio degli animali e dell'uomo. Gli operatori agricoli possono subire contaminazioni a partire dalle azioni di distribuzione dell'acqua, anche se la via più comune è il consumo di prodotti vegetali freschi (frutta e ortaggi) irrigati con acque contaminate.

I progressi nei programmi di sorveglianza epidemiologica hanno consentito di identificare tale associazione. Tuttavia, i cambiamenti nelle abitudini alimentari, nei metodi di produzione e lavorazione di frutta e ortaggi, e l'emergenza di patogeni opportunisti hanno aumentato il rischio di tali episodi epidemici. In letteratura sempre più numerosi sono gli studi che indicano che gli ortaggi crudi possono ospitare potenziali patogeni (Rai PK et al., 2007, Fröder H et al., 2007). Lo spettro di microrganismi veicolati dagli alimenti include una varietà di batteri enterici, aerobi e anaerobi, virus e parassiti (Tauxe R, 2002). La via più generalizzata è però rappresentata dall'entrata di sostanze tossiche nella catena alimentare e dalla contaminazione del prodotto edule da parte di germi patogeni, che possono esercitare effetti negativi sull'uomo in quanto ultimo step della catena.

L'obiettivo di questo lavoro è stato quello di studiare le complesse interazioni tra il consumo di alimenti coltivati in ambiti in cui non sempre si rispettano le norme igieniche delle acque ed il metabolismo umano, con ricadute sul sistema immunitario, per individuare i principali fattori di rischio per la salute.

CAPITOLO 1

1.1. Le acque destinate all'irrigazione: aspetti normativi e sanitari

Le conseguenze dell'inquinamento delle acque su settore agricolo possono risultare gravi e di rilevanti dimensioni. Infatti basti pensare che, a livello nazionale, il consumo d'acqua irrigua supera quantitativamente la somma dei consumi di tutti gli altri tipi di utilizzazione.

Come si vedrà più avanti la destinazione d'uso a scopo irriguo ha bisogno di definizioni per quanto attiene agli standard di qualità, così come già avvenuto per altri comparti (potabili, balneabili, industriali).

Prima di affrontare le problematiche specifiche connesse all'impiego irriguo, può risultare utile un inquadramento generale del problema (Giardini L. et al., 1993).

1.1.1. Le acque sotterranee

Per acque sotterranee si intendono *“le acque che si trovano al di sotto della superficie del terreno, nella zona di saturazione e in diretto contatto con il suolo e il sottosuolo”* (d.Lgs 152/2006, art 54 lettera d).

Le attività antropiche e gli eventi naturali possono essere causa di contaminazione degli acquiferi, che possono arricchirsi di materiali indesiderati tra i quali possono essere annoverati microrganismi come batteri, virus e protozoi patogeni (Gallay A et al., 2006; Asano T. et al., 2004, Paymant P., 2001). L'incremento della popolazione e la sempre maggiore richiesta di acqua rendono quindi necessario un approccio critico alla gestione delle risorse di acque sotterranee. Ciò deve essere particolarmente sentito per quei territori nei quali le acque sotterranee rappresentano la risorsa idrica preponderante. È il caso del nostro Paese nel quale

l'acqua utilizzata dalla popolazione è in percentuale elevata di provenienza sotterranea l'80% circa (Aulicino A. 2004).

È opinione diffusa che le acque sotterranee siano generalmente di buona qualità, considerata la naturale azione del terreno che funziona come un vero e proprio filtro nei confronti di microrganismi contaminanti provenienti dagli strati superiori della crosta terrestre. In realtà non sono ben conosciuti e approfonditi aspetti peculiari e importanti di questo tipo di risorse idriche, in particolare, la loro distribuzione, i loro movimenti e la loro suscettibilità alla contaminazione. In conseguenza di ciò possono essere attuate azioni le cui conseguenze si estrinsecano in veri e propri danni su un tipo di risorsa che dovrebbe essere considerata preziosa.

Rispetto alle acque superficiali, quelle sotterranee dovrebbero essere di qualità igienica migliore poiché gli strati del suolo agiscono su di esse come filtri naturali (Cerbini G. et al., 2004). Questo tipo di risorsa, comunque, può risultare contaminata da apporti provenienti dagli strati superiori o dalla superficie dei terreni e, in funzione del tipo di terreno che attraversa può mantenere o meno i contaminanti acquisiti. I batteri contenuti nelle acque e, quindi, anche quelli di origine enterica e, tra essi, anche i patogeni, che attraversano i suoli sono, infatti, per la maggior parte filtrati dal suolo perché si adsorbono al materiale particellato ivi presente. I batteri sono biocolloidi caricati e la loro rimozione dalle acque percolanti è inversamente proporzionale alla grandezza delle particelle del suolo. Una volta adsorbiti possono rimanere in questo stato per periodi di tempo variabili in funzione di diversi fattori. I fattori che agiscono sull'adsorbimento batterico al suolo sono:

- ❑ presenza di cationi, che riducono le forze repulsivi batteri/particelle del suolo,
- ❑ presenza di minerali di argilla, che forniscono i siti di adsorbimento sulle particelle del suolo
- ❑ concentrazioni di sostanze organiche solubili, che competono con i microrganismi sui siti di adsorbimento delle particelle del suolo,
- ❑ valori di pH, per cui l'adsorbimento microbico aumenta in funzione inversa al suo valore.

Una volta adsorbiti al suolo i batteri possono permanervi per periodi variabili in funzione di diversi fattori. I principali fattori che influenzano questa persistenza sono:

- ❑ luce solare e temperatura (per gli strati più superficiali dei suoli)
- ❑ umidità,
- ❑ pH,
- ❑ sostanze organiche,
- ❑ tipo di microrganismo,
- ❑ microflora antagonista, che è rappresentata da batteri autoctoni e da protozoi predatori,
- ❑ la disseccazione del suolo è un fattore importante di controllo per la sopravvivenza batterica (la diminuzione dell'umidità comporta diminuzione della persistenza batterica).

Poiché, dunque, i corpi idrici sotterranei rappresentano fonti importanti di approvvigionamento idropotabile, la loro contaminazione ha implicazioni soprattutto per quanto riguarda la salute umana.

Alla luce di queste brevi premesse appare chiaro che, per una oculata gestione delle acque sotterranee, è corretto ed efficace affrontare ognuno di questi aspetti considerandoli in un approccio globale. Va, perciò, perseguita la gestione globale dei bacini idrogeologici, considerandone gli aspetti geologici, idrologici, analitici e pedologici. Inoltre mai come oggi è importante l'aspetto della comunicazione gestionale, che significa coinvolgimento della popolazione, sia quella utilizzatrice della risorsa, sia quella coinvolta come del bene pubblico.

1.1.2. Gli aspetti normativi

L'agricoltura irrigua sta assumendo sempre più rilevanza negli scenari di sviluppo del Mezzogiorno. Gli ordinamenti colturali irrigui rappresentano infatti un punto di forza in termini di reddito e di occupazione, per cui diventa strategico garantire una gestione dell'acqua più efficiente, recependo i vincoli e le opportunità della nuova Politica Agricola Comunitaria. Al

tempo stesso, l'agricoltura irrigua deve sapersi relazionare alle necessità ormai imprescindibili di uso razionale e di tutela di una risorsa naturale limitata. Il settore irriguo, infatti, più di altri utilizza l'acqua quindi deve concorrere al risparmio della risorsa idrica, anche mediante il riutilizzo delle acque reflue. Altrettanto importante è il ruolo che l'agricoltura può svolgere rispetto alle esigenze di tutela ambientale, soprattutto in relazione ai fenomeni di inquinamento delle acque e di degrado del territorio. Una buona pratica agricola, infatti, può concorrere in maniera determinante alla tutela dell'assetto idrogeologico e alla riduzione dei fenomeni di desertificazione in atto in ampie fasce del territorio meridionale dell'Italia. (INEA, 2000).

Uno dei maggiori motivi di preoccupazione è la possibilità di depauperamento delle risorse idriche, che può avvenire per cause naturali o antropiche. Da ciò è derivata la necessità di predisporre piani di tutela quanti-qualitativi delle risorse idriche, che ha visto nel tempo l'emanazione di un'ampia legislazione in materia (D.P.R. 236/88, Legge 183/89, legge 36/94, D.lgs 152/99) che attualmente è riconducibile a due principali riferimenti legislativi: il D.lgs. del 2 febbraio 2001 n° 31 (attuazione della Direttiva 98/83/CE relativa alla *qualità delle acque destinate al consumo umano pubblicato* sulla GU n°52 del 03/03/2001 – suppl. Ordinario n° 41) e il D.lgs. del 3 aprile 2006 n° 152 (*norme in materia ambientale pubblicato* sulla GU n° 88 del 14/04/2006).

Nello specifico, il d.lgs 152/2006 prevede alla PARTE TERZA (*Norme in materia di difesa del suolo e lotta alla desertificazione, di tutela delle acque dall'inquinamento e di gestione delle risorse idriche*), Sezione III (*Gestione delle risorse idriche*), Titolo IV (*Usi produttivi delle risorse idriche*) i riferimenti per una corretta gestione delle risorse destinate a scopi irrigui. In particolare gli art. 166 (*Usi delle acque irrigue e di bonifica*) e art. 167 (*Usi agricoli delle acque*) forniscono indicazioni sul corretto utilizzo della risorsa idrica, rifacendosi alle disposizioni dettate dal regio decreto n°1775 del'11 dicembre 1933.

Ciononostante sebbene sia ben definito il corretto management, il provvedimento normativo non fissa standard di qualità per l'uso dell'acqua in ambito agricolo né sono previste disposizioni in

tal senso nei testi attualmente in via di approvazione. In effetti, a livello normativo sono pochi i Paesi che hanno fissato standard di legge per la qualità delle acque per uso agricolo. Grande attenzione è stata rivolta ai microinquinanti inorganici (tutti i Paesi fissano infatti limiti più o meno rigorosi per i metalli), mentre invece non vengono considerati né i microinquinanti organici (con l'eccezione del benzene nel caso di Ungheria e Cina) né soprattutto la componente microbica. Inoltre, non vengono prese in considerazione variabili che tengano conto del tipo di terreno, delle caratteristiche della coltura e dei diversi metodi irrigui, probabilmente a causa del fatto che, in generale, le acque allo stato naturale presentano requisiti di qualità idonei. Tuttavia, va detto che le acque dei corpi idrici interessati, direttamente o indirettamente, dallo sversamento di reflui di attività antropiche potrebbero contenere composti chimici e biologici potenzialmente dannosi per le colture o per l'uomo, con effetti sia a breve che a lungo termine. Proprio in relazione alle problematiche sopra esposte, molti autori ed istituzioni hanno proposto, nel corso degli ultimi decenni, criteri di classificazione delle acque naturali da utilizzare in ambito agricolo. Tra gli altri, in Italia è stata definita una classificazione elaborata da Giardini, Borin e Grigolo (1993), che mira alla definizione di uno strumento più completo di quelli esistenti, da ottenere attraverso l'integrazione di informazioni relative sia alle acque usate sia alle condizioni agronomico-ambientali del comprensorio irriguo. A tal fine, i parametri di qualità dell'acqua irrigua vengono riuniti, in funzione delle loro caratteristiche e della loro pericolosità, in tre gruppi, denominati A, B e C, corrispondenti, rispettivamente, ai parametri chimici fondamentali, ai parametri microbiologici e a quelli complementari. I parametri del gruppo A possono dar luogo a fenomeni di fitotossicità o accumulo; i parametri del gruppo B possono determinare implicazioni di origine igienico-sanitaria, per cui influenzano sia la metodologia di applicazione dell'acqua, sia il tipo di coltura irrigata; i parametri del gruppo C, infine, forniscono indicazioni sullo stato del corpo idrico utilizzato per l'approvvigionamento. Per ciascun gruppo di parametri sono state individuate le classi di qualità irrigua, che definiscono le modalità di apporto delle acque ed il loro dosaggio.

In questo lavoro, tenuto conto dell'assenza di norme nazionali ufficiali di riferimento, ci si è riferiti, per quanto attiene ai limiti per i parametri microbiologici, alle indicazioni dettate da questa tipologia di classificazione (Tabella in allegato)

1.1.3. Gli aspetti sanitari

La presenza di microrganismi patogeni nelle acque superficiali è conseguenza prevalentemente dello scarico di effluenti di insediamenti urbani non depurati o trattati solo parzialmente e, sia pur in maniera minore, di allevamenti zootecnici. I corpi idrici che ricevono reflui presentano infatti una carica batterica di molto superiore a quella di origine diversa.

Acque sotterranee contaminate da microrganismi patogeni possono essere causa di affezioni di tipo epidemico nella popolazione (Volterra L., 2000). Nonostante l'importanza della conoscenza della diffusione di malattie di origine idrica usualmente descritte come epidemie, nel nostro territorio e in Europa (eccetto che per la Gran Bretagna) i dati al riguardo sono scarsi poiché non vi è un organizzato sistema di sorveglianza per la rilevazione di malattie di origine idrica nella popolazione e le indagini (incluse le analisi delle acque) per accertarne le cause. Purtroppo anche in paesi industrializzati mancano le risorse sia di personale che economiche che supportino questo tipo di indagini. Non sono previsti neanche impieghi di risorse per l'educazione e la sensibilizzazione della popolazione in tema di potenziale diffusione di malattie l'utilizzo dell'acqua da bere. Dati di questo tipo sono disponibili relativamente a paesi come UK e USA. Negli Stati Uniti dal 1971, il CDC (Centers for Disease Control and Prevention), l'EPA (Environmental Protection Agency) e il CSTE (Council of State Territorial Epidemiologists) collaborano per l'organizzazione e il funzionamento di un sistema di sorveglianza per la rilevazione di epidemie di origine idrica e l'accertamento delle cause. Le cause degli episodi

epidemici sono risultate ascrivibili a 3 diverse classi : **AGI** (Acute Gastrointestinal Illness of unknown etiology: affezioni gastrointestinali acute di etiologia sconosciuta), **infezioni**, e **sostanze chimiche tossiche**. Gli episodi epidemici sono imputabili per percentuali variabili dal 25% al 68% a cause sconosciute (AGI), per il 25%-60% ad infezioni dovute a microrganismi patogeni e per il 7%- 15% a sostanze chimiche tossiche. Le affezioni per le quali non è stato riconosciuto l'agente etiologico (AGI) sembrano, imputabili per una buona percentuale, per il complesso dei sintomi mostrati dalle persone implicate nelle epidemie, a contaminanti di origine virale (MMWR 2000, MMWR, 2002). Episodi di intossicazioni da sostanze chimiche risultano indotti da presenza elevata di nitriti e di nitrati nelle acque, evidenziati dopo episodi di metaemoglobinemia in bambini da presenze elevate di rame e di piombo, rilasciati dalle condutture o da vasche di stoccaggio dell'acqua (Cinnerella S. et al., 2005) ma anche da presenza di elevate quantità di fluoruri. Anche le attività zootecniche, infatti, costituiscono fonti di inquinamento delle acque sotterranee perché ne influenzano, ovviamente, le caratteristiche chimiche, ma anche quelle microbiologiche (Mallin MA. et al., 2000; Edwards DR et al., 1992). Da un punto di vista batteriologico diversi sono gli organismi coinvolti, come *Escherichia coli*, che se trovano condizioni ambientali idonee, possono sopravvivere anche per mesi (Davies CM et al., 1995).

I microrganismi patogeni coinvolti sono, in larga misura, batteri, come *Escherichia coli* O157:H7, *Campylobacter jejuni*, e *Shigella*, ma anche virus enterici, come Norwalk virus, e protozoi come *Cryptosporidium parvum* e *Giardia spp.*

Tra i patogeni emergenti *Escherichia coli* O157:H7 è una specie tossigena che causa pericolose gastroenteriti emorragiche che, nel 15% dei casi, evolvono in sindromi uremiche emolitiche, anche fatali. È stata isolata per la prima volta nel 1982, nell'ambito di una epidemia di diarrea emorragica causata dal consumo di carne di manzo poco cotta. La sopravvivenza di questo stipite di *E. coli* sembra essere molto prolungata in acqua a bassa temperatura (5 °C) (Swerdlow DL. et al, 1992). In ogni caso i Gram negativi sono quelli presenti in maggiori quantità. Uno studio

realizzato nel 1985 ha evidenziato una flora batterica composta per 2/3 da Gram negativi (Balkwill DL., 1985, Chapelle FH, 2001). Tra i batteri presenti negli acquiferi *Pseudomonas spp* è il genere predominante, annoverando specie molto versatili in quanto a sostanze organiche da utilizzare come nutrimento. Hanno un metabolismo di tipo respiratorio non riescono ad operare fermentazione in condizioni di anaerobiosi, pur tuttavia possono usare vie alternative per il meccanismo respiratorio in carenza di ossigeno, ad esempio, utilizzando il nitrato come accettore di elettroni (Chastre J., et al., 2000).

Il suo riscontro nelle acque potabili è generalmente indice del deterioramento della qualità microbiologica, ciò dovuto alla presenza di nutrienti o ad un trattamento di potabilizzazione insufficiente. Infatti, *P. aeruginosa* per la capacità di produrre muco (composti alginati) è piuttosto resistente ai trattamenti chimici con cloro e derivati (Grobe S et al, 2001).

P. aeruginosa è considerato un importante patogeno opportunista ed è uno dei principali agenti di infezioni nosocomiali (10-20%); può provocare infezioni delle vie urinarie, delle ustioni e delle ferite, ulcere corneali e cheratiti, setticemie, gastroenteriti nei neonati, ascessi, broncopolmoniti e meningiti. Negli anni recenti, a causa dell'utilizzo diffuso di antibiotici e di altri agenti battericidi, al quale tale microrganismo è notoriamente resistente è diventato un importante agente di infezioni animali ed umane, in particolare per individui immunodepressi (Carraro E. et al, 2004).

1.1.4. La scelta degli indicatori

La presenza di patogeni è solitamente accompagnata dalla presenza degli indicatori classici di contaminazione come coliformi totali, coliformi fecali, *Escherichia coli* ed enterococchi (Karapinar M. 1991). Diversi studi mostrano come questi indicatori sono considerati efficienti nell'evidenziare la presenza di patogeni (Baghel VS et al. 2005, Schaffter N., 2002).

Una volta raggiunto il corpo idrico, la concentrazione di patogeni è soggetta a variazioni: generalmente diminuisce con intensità variabile in funzione della specie considerata e delle caratteristiche dell'ambiente acquatico (Hussain M et al., 2007).

I parametri microbiologici indagati sono stati scelti, in parte, considerando i batteri patogeni (*Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus*) che più spesso sono ritrovati nelle acque (Shirvastava R., 2004) e la cui presenza rende la risorsa inutilizzabile per un uso diretto (D.lgs. 31/2001) e in parte valutando la presenza e la quantità di altri microrganismi non sempre patogeni, ma che in determinate condizioni possono diventarlo (*Aeromonas spp*) (Ko WC., 2005). Numerosi studi epidemiologici sono stati condotti su disturbi gastrointestinali presentati dal bagnanti in acque marine e dolci, che stabiliscono un'associazione con la presenza dei batteri considerati indicatori di inquinamento fecale. In particolare alcuni soggetti risultano essere i più colpiti: bambini, donne in gravidanza, anziani e soggetti immunocompromessi (Nwachuku N. et al., 2004). Gli altri parametri indagati, considerati indicatori di contaminazione, possono fornire utili indicazioni sulla presenza o assenza di patogeni. La probabilità di trovare patogeni in assenza di indicatori è molto bassa, e gli indicatori come *Escherichia coli*, ed enterococchi sono risultati adeguati nel segnalare la presenza dei patogeni nel 90% dei casi (Schaffter N., 2002).

Tutti i batteri patogeni e patogeni opportunisti sono batteri eterotrofi molti dei quali crescono su terreni di coltura agarizzati solitamente utilizzati per la determinazione della conta batterica totale. Con il termine batteri eterotrofi (HPC o CBT) si indicano i batteri capaci di utilizzare la materia organica e sono presenti in diverse fonti. Sono noti anche con altri termini come “conta totale”, “conta batterica totale”, “flora autoctona”, ecc. Tutti questi termini descrivono una popolazione di batteri in grado di crescere in condizioni di tempo e temperature definite (Allen MJ., 2004). Temperature di 35-37 °C e brevi tempi di incubazione (24-48 h) favoriscono la crescita di batteri che derivano dall'uomo o da animali; temperature più basse (20-25 °C) e tempi più lunghi di incubazione (5-7 giorni) favoriscono la crescita dei batteri naturalmente presenti nelle acque (Reasoner DR., 1990). Tra i patogeni che possono far parte degli HPC vi sono

Aeromonas spp, *Pseudomonas spp*, *Klebsiella spp*, e per questo diversi autori suggeriscono di considerare l'HPC un parametro da ricercare nell'acqua destinata al consumo umano, al fine di salvaguardare la salute dell'uomo (Ashbolt NJ. et al., 2001). Sebbene studi epidemiologici (Hellard ME et al., 2001, Calderon RL et al., 1991) abbiano dimostrato la non associazione tra HPC elevate e stati patologici, la determinazione di questo valore può mettere in evidenza cambiamenti di qualità microbiologica nelle fasi di stoccaggio e distribuzione (Allen MJ., 2004), così come previsto dalla definizione dell'attuale normativa sulle acque destinate al consumo umano che prevede come indicazione la dicitura “*senza variazioni anomale*”(D.lgs. 31/2001). Anche quando gli inquinanti inorganici non indicano uno stato di contaminazione tale da rappresentare un danno alla salute umana, la presenza di indicatori microbiologici di contaminazione fa sì che la risorsa venga considerata inadatta ad uso diretto (Krapac IG., 2002). Appare dunque evidente come sia necessario, per determinare la qualità di un acquifero valutare i parametri chimici, ma soprattutto i parametri microbiologici.

1.1.5. I sistemi di potabilizzazione delle acque

Il più diffuso sistema di disinfezione è quello che prevede l'uso di composti del cloro che, disciolti in acqua, rapidamente inattivano i coliformi fecali ed *Escherichia coli*; poiché, però, essi hanno un effetto tardivo su diversi altri patogeni, possono indurre un falso senso di sicurezza (Payment P.,1991) di cui bisogna tener conto. Non a caso, infatti, è stato possibile isolare da campioni di acqua clorata batteri quali *Pseudomonas aeruginosa* e *Aeromonas hydrophila* (Fernández M.C., 2000), mettendo così in evidenza una particolare resistenza alla clorazione dei due microrganismi stessi. Questa caratteristica è probabilmente legata alla produzione di uno strato protettivo che impedisce il contatto della cellula batterica con il cloro. È stato osservato che le colonie cloro resistenti di *Pseudomonas aeruginosa* presentano mucose per una iperproduzione di alginati extracellulari, il che suggerisce un ruolo attivo di questo strato

protettivo nella protezione dall'azione del cloro (Dussart L., 2003; Grobe S., 2001). Anche se la clorazione è da tempo il metodo più comunemente utilizzato per la disinfezione dell'acqua potabile, in molti casi il potere germicida del cloro non si è rivelato sufficiente (Shrivastava R., 2004). La stabilità del cloro libero nell'acqua dipende, infatti da diversi fattori: la sua concentrazione, la presenza di fenomeni di catalisi, il pH della soluzione, la temperatura, la presenza di materiale organico e la radiazione ultravioletta (Block SS., 1991).

Uno dei sistemi alternativi alla clorazione, conosciuto da molto tempo è costituito dalla filtrazione su substrati quali carbone, sassi porosi, materiali ceramici. Questo metodo è risultato efficace nell'eliminare i batteri patogeni dall'acqua (Baker M.N., 1981)

Sono diversi gli studi condotti per cercare delle tecnologie alternative di disinfezione dell'acqua destinata al consumo umano, in quanto la clorazione e l'ozonizzazione non sono efficienti per l'inattivazione di alcuni patogeni. È stato, infatti, dimostrato che batteri produttori di spore come *Clostridium perfringens* sono molto poco sensibili al cloro residuo presente nell'acqua (Araujo M., 2004; Payment P., 1993).

Numerosi sono i casi di cryptosporidiosi associati al consumo di acqua potabile (Finch G.R., 2001). È ben nota la resistenza alla clorazione di alcuni protozoi e di diversi virus enterici così come la notevole sopravvivenza delle oocisti di *Cryptosporidium parvum* nell'ambiente (Hambidge A., 2001).

Inoltre l'uso di questi disinfettanti comporta la produzione di prodotti inquinanti secondari.: il cloro, per esempio, in presenza di materiale organico dà luogo alla formazione di composti quali i trialometani che hanno azione mutagena (WHO, 2004).

Differenti sistemi di trattamento dell'acqua potabile basati sulla radiazione solare sono stati messi a punto a partire dagli anni '90 (Cooper AT et al, 1998a; Cooper AT et al, 1998b; Goswami DY, 1997). In particolare l'uso della radiazione solare per disinfettare l'acqua potabile è stato studiato utilizzando dei sistemi discontinui dove l'acqua è immagazzinata in piccoli contenitori trasparenti esposti alla luce solare: purtroppo, però, il volume di acqua disinfettata

con questo metodo in ogni contenitore è limitato (Conroy RM et al., 1996). Il processo fotocatalitico può essere aiutato introducendo additivi chimici come il blu di metilene (Cooper AT et al, 1999) o il biossido di titanio in sospensione o fissato su substrati (Salih FM, 2002; Block SS et al., 1997; Cooper AT et al., 1997). La fotocatalisi, infatti, è, ad oggi, un possibile metodo alternativo per trattare l'acqua potabile. Diversi studi hanno indicato che la fotocatalisi è efficiente nel rimuovere inquinanti organici, inorganici e i microrganismi (Vidal A., 2000; Vidal A., 1999; Blake DM., 1999)

Come si è visto, ci sono diversi patogeni enterici, che hanno un comportamento differente rispetto a *Escherichia coli*, soprattutto per quanto riguarda la resistenza alla disinfezione e la sopravvivenza nell'ambiente (Ashbolt NJ., 2004), anche se alcuni studi hanno dimostrato l'efficacia di sistemi combinati a raggi U.V.A. ed ossido di titanio che consentono di abbattere la carica batterica di *Escherichia coli* e di altri patogeni quali *Pseudomonas aeruginosa* di almeno 6 logaritmi (Kühn KP., 2003).

1.2. L'inquadramento geografico

Il lavoro è stato eseguito concentrando le azioni nell'ambito di un'area – pilota che è stata individuata nel paese di Candida, un piccolo comune nella provincia di Avellino, sull'Appennino campano, a 623 m sul livello del mare, ricco in sorgenti.

Questo comune, che si estende su una superficie di 5,43 kmq dove risiedono circa 1000 abitanti, fa parte del massiccio carbonatico del Terminio-Tuoro, ubicato ad est di Avellino; questa struttura geologica è formata dai rilievi compresi tra l'alta valle del fiume Sabato ad ovest e l'alta valle del fiume Calore ad est, che costituisce la parte più settentrionale dei monti Picentini.

Il massiccio montuoso dell'area di riferimento è costituito da litotipi mesozoici calcareo-dolomitici, altamente permeabili per fatturazione e carsismo. Ai suoi margini, nonché al suo

interno, affiorano depositi terrigeni terziari (argille Varicolori, Flysch di Castelvetro.) La copertura dei suddetti litotipi è costituita da depositi detritici, alluvionali e piroclastici recenti.

L'assetto strutturale del massiccio è il prodotto della sovrapposizione di diversi sistemi di faglie succedutesi nel tempo (Civita M., 1969). Tra queste, le più importanti dal punto di vista idrogeologico sono le faglie dirette del Sabato e del Calore che delimitano rispettivamente ad Ovest ed ad est il massiccio carbonatico, e la linea tettonica, con andamento est-Ovest, sita lungo il margine meridionale della Piana del Dragone (Civita M., 1969). Successivamente la fase tettonica Plio-Quaternaria, a carattere essenzialmente distensivo e con faglie ad orientamento tirrenico ed appenninico ha poi modificato l'assetto strutturale precedente, dislocando i vari blocchi, riprendendo antiche linee di faglia e costituendo in tal modo un vero e proprio reticolo di deflusso sotterraneo (Coppola L. et Al., 1990). Tale fratturazione delle rocce ha condizionato l'idrodinamica sotterranea, direttamente, formando il suddetto reticolo, ma anche indirettamente favorendo lo sviluppo di un fenomeno carsico a grande scala, che ha permesso l'infiltrazione delle acque di precipitazione, incrementando quindi le risorse idriche dell'acquifero, e originando numerosi sorgenti di alta quota.

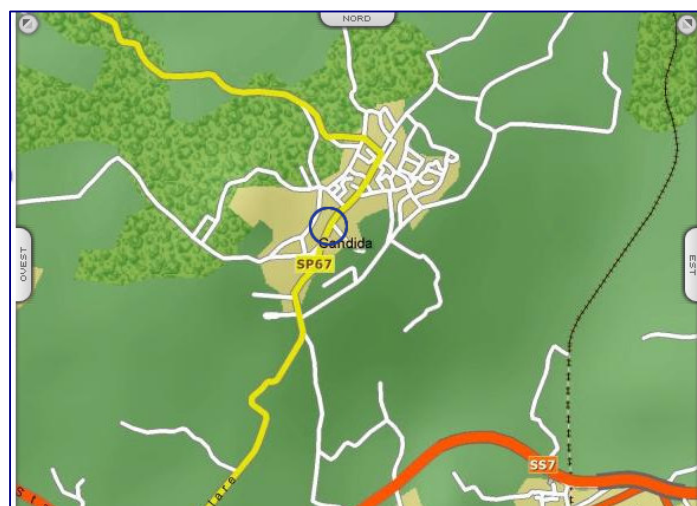
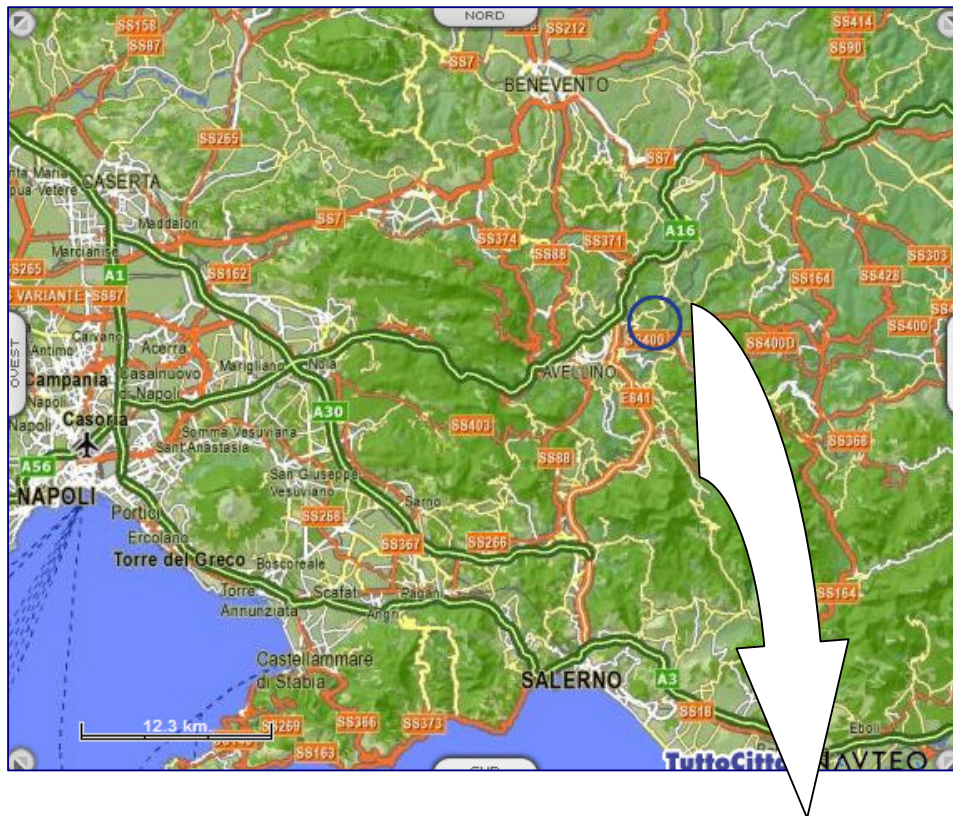
La circolazione idrica sotterranea avviene esclusivamente nel complesso calcareo, la cui alta permeabilità è dovuta all'intensa fratturazione delle rocce e al carsismo (Celico P., 1982). La presenza di impermeabili intercalari ha creato le condizioni per l'instaurarsi di falde sospese; queste, insieme al fenomeno carsico sopraccitato, hanno dato luogo alle numerose sorgenti di alta quota. All'interno dell'unità idrogeologica sono, infatti, individuabili quattro sub-unità, che trovano recapito in altrettanti gruppi di sorgenti.

Le sorgenti, oggetto di studio in questo lavoro, fanno parte del gruppo che ha origine lungo il margine settentrionale del monte Tuoro, le cui portate, sebbene a carattere perenne, non sono di rilevante entità. La genesi è sempre da porre in relazione ai complessi contatti tettonici tra calcari mesozoici e i Flysch terziari. Le maggiori emergenze si rinvennero al contatto tra i calcari e le

argille e tra i calcari e le arenarie, in corrispondenza dei maggiori sistemi di fratture, che fungono chiaramente da dreni preferenziali (Aquino S. et Al., 2001).

Quasi tutte le sorgenti, dotate di abbeveratoi, sono utilizzati per usi locali.

Figura 1: inquadramento geografico: Candida (Av)



1.3. Prodotti vegetali: aspetti sanitari e normativi

La frequenza di documentati focolai epidemici a causa di consumo di frutti e vegetali consumati crudi è aumentata negli ultimi anni (Hamilton AJ., et al., 2006). Ciò dovuto, probabilmente, ai cambiamenti nelle abitudini alimentari, all'introduzione di nuovi metodi di produzione dei prodotti alimentari, e la recrudescenza di patogeni emergenti non sempre associati con il consumo di cibi crudi (Beuchat LR. et al., 1997, Hedberg CW. et al., 1994). Molti batteri, responsabili di patologie gastrointestinali, come *Salmonella spp*, *Escherichia coli O157:H7*, *Shigella spp* sono stati associati ad alimenti consumati crudi, come lattuga, carote, melone, pomodoro (Delaquis P. et al., 2007, Burnett SL. et al., 2001).

Nonostante le premesse, poco ancora si conosce circa il comportamento della microflora che generalmente colonizza frutta e vegetali (Beuchat LR, 2002). Medesime considerazioni sono possibili per il comportamento dei patogeni. Gli ecosistemi microbici dipendono da diversi fattori, quali pratiche agronomiche, aree geografiche di produzione, condizioni meteorologiche prima del raccolto, nondimeno dal rimaneggiamento, dal packaging, e dalle altre pratiche di distribuzione (Ragaert P. et al., 2007, Brackett RE., 1999, Lund BM., 1992). Infatti qualunque azione meccanica a carico di foglie, radici e frutti provoca il rilascio di fluidi nutrienti e antimicrobici, come acidi organici, che possono aumentare o ritardare la crescita della microflora o dei patogeni. In ogni caso la perdita di fluidi biologici determina colonizzazione e sviluppo di biofilm, che si ripercuote nel deterioramento del vegetale e nella crescita di patogeni (Burnett SL. et al., 2001). Tra gli ortaggi di superficie, i vegetali in foglia, dato l'elevato rapporto superficie/volume e la bassa resistenza che offrono i tessuti epiteliali, sono alimenti quelli più facilmente contaminabili.

La particolarità di questi prodotti sta nel fatto che in molti casi sono freschi e che, senza subire particolari trattamenti tecnologici, si devono conservare mantenendo la turgidità, il colore e le

caratteristiche in genere del prodotto appena colto garantendo inoltre la sicurezza da un punto di vista igienico-sanitario. In particolare, prodotti come l'insalata possono essere mescolati con altri alimenti e dare origine a pericolose contaminazioni crociate (Fröder H. et al., 2007).

L'insalata, avendo un pH superiore a 5.1, è un ortaggio facilmente contaminabile, mentre gli ortaggi con un valore di pH compreso tra 4.5 e 5.1, come i pomidori, sono più difficilmente attaccabili. I rischi associati alla diffusione dei microrganismi dal suolo all'interno di questi vegetali sono bassi sia perché i tuberi hanno un tessuto epiteliale resistente che funge da barriera, sia perché sono sempre pelati e quindi è rimossa la parte contaminata (Barry-Ryan C. et al., 2000).

Per quanto concerne gli aspetti normativi in Italia non esistono limiti precisi per i prodotti vegetali. Per questo motivo ci si è riferiti all'O.M. dell'11/10/1978, al Regolamento 2073/2005 della Commissione Europea del 15 novembre 2005 “*sui criteri microbiologici applicabili ai prodotti alimentari*” e alla delibera n° 1120 del 06/07/2005 della Regione Umbria, aggiornamento della D.G.R. n° 5310 del 07/07/94, l'unica che impone limiti precisi. Ci si è riferiti anche alle indicazioni del Decreto ministeriale della Repubblica Francese del 22/03/1993 sul prodotto “*Verdure lavate (da consumarsi crude)*”, che stabilisce alcuni valori guida.

1.4. Prodotti vegetali di IV gamma

Gli ortaggi e la frutta di IV gamma o *minimally processed*, sono una categoria di alimenti vegetali freschi ad alto contenuto di servizio in quanto vengono sottoposte a minime lavorazioni atte a renderle pronti al consumo. Le lavorazioni minime in genere consistono in lavaggi, tagli e confezionamento in vaschette o *bags* di materiale plastico a permeabilità selettiva per i gas (generalmente polietilene) a cui si accompagna la conservazione in atmosfera modificata. In tal modo il prodotto ortofrutticolo raggiunge una *shelf-life* (vita da scaffale) di gran lunga maggiore rispetto al medesimo prodotto commercializzato fresco.

Il termine IV gamma è stato coniato in Francia alcuni anni fa, facendo riferimento all'evoluzione storica dell'impiego degli ortaggi, indicando:

I GAMMA gli ortaggi nella loro presentazione tradizionale (es. il cespo di insalata intera comunemente confezionato in cassette);

II GAMMA le conserve vegetali (es. la passata di pomodoro);

III GAMMA gli ortaggi congelati (es. minestrone);

IV GAMMA gli ortaggi e frutta, freschi trasformati e pronti per l'uso, senza alcun tipo di additivo (es. insalate tagliate vendute in buste o vaschetta);

V GAMMA gli ortaggi precotti, grigliati o scottati a vapore senza l'aggiunta di conservanti o condimenti.

Negli anni '70, negli Stati Uniti gli ortaggi di IV Gamma venivano già commercializzati, mentre nei mercati europei tali prodotti si sono imposti solo negli ultimi anni, soprattutto in Belgio, Germania, Paesi Bassi, e Francia.

Attualmente i *minimally processed* stanno riscotendo un particolare successo nelle aree più interessate al cambiamento dello stile di vita, contrassegnato da ritmicità, riduzione della pausa pranzo, ecc) che ha coinvolto anche il modello del consumo alimentare. Tali mutamenti si sono tradotti in una richiesta di cibi di elevata praticità d'impiego, fra cui compaiono, appunto, i prodotti di IV gamma (Rapp. ISMEA, 2005, Della Casa R., 2003). Gli ortaggi e la frutta per essere commercializzati in vaschette, necessitano di un insieme di lavorazioni che provvedono a garantire il carattere di freschezza del prodotto, in abbinamento alla ridotta o assente preparazione per il consumo fresco. La gradevolezza può essere limitata dal subentrare di alterazioni indesiderabili che sono maggiormente rappresentate dai fenomeni ossidativi e dal rammollimento, riconducibili alla natura stessa del vegetale e dal venir meno della compartimentazione cellulare che viene sollecitata dal taglio, operazione indispensabile e che caratterizza questa categoria di prodotti (Toivonen PMA et al., 2002, Watada A. et al., 1996).

Da un punto di vista microbiologico molte sono le specie batteriche ritrovate e isolate nei prodotti di IV gamma. Dopo il processamento i valori della conta batterica totale oscillano tra 10^3 e 10^6 UFC/g (Ragaert P. et al., 2007). Le specie dominanti appartengono alle *Pseudomonadaceae* (particolarmente *P. fluorescens*) e alle *Enterobacteriaceae* (Lund BM, 1992; Nguyen C et al., 1994; Vankerschaver K et al., 1996; Bennik MHJ et al., 1998). I *minimally processed* possono essere contaminate anche da agenti patogeni umani, presenti prima, durante o dopo la raccolta. Le fonti possibili di contaminazione sono i semi, il terreno, l'acqua di irrigazione, gli animali, tutte le fasi di processo e soprattutto il packaging (Brackett RE, 1999, Francis GA et al. 1999, Seymour IJ et al. 1999, Everis L, 2004, and Sivapalasingam S. et al. 2004).

1.5. La PCR nella microbiologia ambientale e alimentare

Il principio di base della reazione a catena della polimerasi (PCR) diventa reale nel 1985 con la pubblicazione del primo esperimento di amplificazione del DNA.

Una delle applicazioni più interessanti della PCR è la possibilità di ottenere dei “*molecular fingerprinting*”, un'impronta digitale molecolare di un (micro)organismo, che permette di distinguerlo da “individui” strettamente correlati dal punto di vista genetico (tipizzazione) (Fothergill JL. et al, 2007).

Il passaggio evolutivo della scelta è da attribuire a tre motivi fondamentali:

- a) per identificare (dare un nome) e/o tipizzare un microrganismo ignoto;
- b) per evidenziare la presenza di un batterio in un determinato ambiente naturale;
- c) per studiare una popolazione batterica naturale, allo scopo di studiarne il polimorfismo genetico, oppure per identificare batteri con particolari proprietà metaboliche.

Le procedure standard di identificazione batterica richiedono l'isolamento di colture pure, seguito da test che analizzano alcune caratteristiche fenotipiche, quali caratteristiche

morfologiche e/o biochimiche (Ricciardi R. et al., 2007). Se alcune di queste metodologie si sono rivelate efficaci per l'identificazione di alcuni batteri, resta il fatto che questi kit sono progettati, di solito, per identificare un numero relativamente ristretto di microrganismi. Per questo motivo negli ultimi anni sono state introdotte molte tecniche biomolecolari che in parte hanno soppiantato le “vecchie” metodologie” (Shannon KE et al, 2007, Tripathy S et al, 2007). In particolare il sequenziamento del tratto ribosomiale 16S dell'RNA, costituito dall'alternarsi di regioni costanti e regioni variabili, fa sì che il trattamento con enzimi di restrizione provochi la formazione di un profilo molto spesso caratteristico di una specie, e in certi casi, di singoli ceppi. Nel nostro lavoro ci siamo avvalsi di queste procedure allo scopo di isolare i batteri ritrovati nelle singole matrici indagate, e di caratterizzarli per definirli e distinguerli dal punto di vista molecolare, in modo da poterli rintracciare lungo la filiera acqua-alimenti-uomo.

CAPITOLO 2

2.1. Scopo del lavoro

La parte sperimentale del presente lavoro è stato condotto seguendo le indicazioni del progetto di dottorato di ricerca in Ambiente, Prevenzione e Medicina pubblica indirizzo Igiene Ambientale.

Il lavoro è stato eseguito concentrando le azioni nell'ambito dell'area – pilota che è stata individuata nel paese di Candida, un piccolo paese nella provincia di Avellino, sull'Appennino campano, ricco in sorgenti. Molte di esse hanno un particolare destino comune: vengono utilizzate dai contadini locali per irrigare i campi che si trovano nelle vicinanze. La scelta del sito può essere addotta per le pratiche agresti presenti, per le dimensioni ridotte della popolazione che permette la rintracciabilità e il possibile biomonitoraggio della filiera “acqua-alimenti-uomo”. Si è, quindi, ritenuto che le analisi conclusive, avendo carattere generale, potessero essere ragionevolmente estrapolate ad aree aventi caratteristiche simili.

Così come presente in letteratura un'acqua che risulti contaminata da batteri, quali coliformi totali, coliformi fecali e streptococchi fecali, può comunque essere destinata all'irrigazione (Mara DD. et al. 2007, Hamilton AJ. et al., 2006, Carr RM., et al. 2004). La possibilità di irrigare i campi con acqua contaminata dipende ovviamente dalla consistenza della contaminazione, cioè dalla “qualità” di queste acque. In questo lavoro, tenuto conto dell'assenza di norme nazionali ufficiali di riferimento, ci si è riferiti, per quanto attiene ai limiti per i parametri microbiologici, alle indicazioni dettate dalla classificazione di Giardini et al. 1993.

Il programma di ricerca ha perseguito l'obiettivo di biomonitorare la qualità delle acque superficiali, in cui non sempre si rispettano le norme igieniche, il tipo di inquinamento, l'eventuale contaminazione dei vegetali irrigati con tali acque e le complesse interazioni tra il consumo di alimenti coltivati in tali ambiti ed il metabolismo umano, con ricadute sul sistema immunitario, per individuare i principali fattori di rischio per la salute.

La scelta degli ortaggi a foglia larga è stata dettata dall'elevato rapporto superficie/volume, dalla bassa resistenza che offrono i tessuti epiteliali, e dalla loro facile e rapida contaminazione. Oltre a ciò si è considerato il fatto che queste categorie di prodotti possono essere consumati crudi, come l'insalata, che in molti casi viene mescolata con altri alimenti e dare origine a pericolose contaminazioni di tipo crociato.

Si è cercato, quindi, di comprendere se esiste veicolazione di batteri, che, introdotti nella filiera attraverso l'utilizzo di acque contaminate, e assunti tramite gli alimenti irrigati con dette acque, possano determinare patologie a carico dell'uomo.

2.2. Organizzazione del lavoro

L'attività sperimentale si è sviluppata in quest'area – pilota, in cui sono state individuate e tipicizzate idonee stazioni di misura in corrispondenza delle quali sono stati effettuati, nel corso dell'intero progetto, accertamenti di natura batteriologica e biomolecolare (APHA, AWWA, WEF, 1995). A tal fine sono stati individuati 3 siti di campionamento di acque superficiali su cui si sono eseguite, con cadenza quindicinale, le analisi batteriologiche per la determinazione della qualità dell'acqua. Successivamente sono state prese in considerazione, con cadenza mensile, tipologie di alimenti quali verdure, acquistate presso gli stessi contadini che utilizzano l'acqua a scopo irriguo. L'esame batteriologico relativo alle matrici alimentari ha seguito le linee relative ai parametri microbiologici previsti dalla delibera della Direzione Generale Sanità della Regione Lombardia e le metodiche utilizzate sono quelle indicate dall'Istituto Superiore della Sanità (De Medicis D. et al., 1996). Nell'ultima parte del progetto sono state condotte indagini cliniche su un numero significativo di pazienti (coprocultura, urinocoltura e tamponi faringei) ricercando i medesimi batteri isolati nelle matrici acqua e alimenti. Infine con la collaborazione della sezione di Microbiologia del Dipartimento di Biologia Strutturale e Funzionale, tutti i batteri isolati e presenti in almeno due matrici sono stati poi sequenziati attraverso metodiche PCR.

In questo modo è stato possibile identificare i ceppi uguali, valutando in questo modo se esiste, una veicolazione dei batteri dalle sorgenti, agli alimenti e quindi all'uomo.

2.3. Identificazione dei siti di campionamento

Delle sorgenti presenti nel comune di Candida ne sono state monitorate tre, in quanto accomunate da un destino comune: tutte e tre sono utilizzate da contadini locali per irrigare dei campi che si trovano nelle vicinanze. Di seguito sono riportate delle foto che inquadrano rispettivamente la sorgente n°1 (*lavatoio comunale*) denominata S1, la sorgente n° 2 (*acqua d'alice*) denominata S2 ed infine la sorgente n°3 (*peschiera*) denominata S3.

Sorgente 1: lavatoio comunale (S1)



Sorgente 2: acqua d'alice (S2)



Sorgente 3: peschiera (S3)



2.4. Materiali e metodi

2.4.1. Acqua

Il prelievo dei campioni è stato effettuato seguendo le indicazioni della norma UNI-EN-ISO 5667-3:1998 che prevede l'utilizzo di recipienti sterili che seguono le usuali norme di asepsi. Il quantitativo di acqua prelevato è standard, cioè due litri. All'atto del prelievo, la bottiglia sterile utilizzata per le analisi microbiologiche è stata aperta avendo cura di non toccare la parte interna del tappo, che va a contatto con il campione prelevato, né l'interno del collo della bottiglia; si è quindi proceduto all'immediata chiusura della stessa subito dopo il prelievo. Le bottiglie non sono state sciacquate all'atto del prelievo in quanto ciò espone le stesse a contaminazione. Nell'effettuare i prelievi, si è avuta cura di non riempire completamente la bottiglia, ma di lasciare uno spazio d'aria tra la superficie libera dell'acqua ed il tappo, al fine di consentire un'efficace agitazione del campione in laboratorio, al momento dell'analisi.

Tutti i campioni prelevati sono stati etichettati in modo chiaro con tutte le indicazioni necessarie alla sua identificazione, quali la data e l'ora del campionamento, il tipo di acqua e sono state altresì trasmesse, con il campione, tutte le indicazioni concernenti le eventuali determinazioni effettuate in loco e qualunque altra informazione che poteva risultare utile nell'interpretazione dei risultati di laboratorio. A parte ogni esigenza di natura giuridica, che può prevedere precise modalità di identificazione del campione, è comunque stato necessario che il campione venisse contrassegnato sia con il codice numerico sia con l'identificazione in chiaro del punto di campionamento. Tali indicazioni sono state riportate su un'etichetta riportata sulla bottiglia. Sono state evitate indicazioni riportate sul tappo o sull'eventuale involucro di carta in quanto frequente causa di scambio di campioni durante la procedura di laboratorio.

Tutti i campioni d'acqua sono stati esaminati nel minor tempo possibile. Il trasporto è avvenuto in modo da tenere i campioni al riparo dalla luce ed ad una temperatura tra i 4°C e i 10°C. Tra il momento del prelievo e l'esecuzione delle analisi non sono mai trascorse più di 24 ore.

L'esame microbiologico delle acque si è basato essenzialmente sulla possibilità di coltivare su idonei terreni, ed in idonee condizioni colturali, i microrganismi contenuti nell'acqua in esame, utilizzando particolari metodologie finalizzate all'individuazione differenziale di specie o di gruppi microbici che si ritengono significativi ai fini del giudizio igienico e/o di qualità dell'acqua, così come previsto dagli allegati tecnici del D.Lgs. 31/2001.

Le analisi batteriologiche ha previsto la ricerca dei seguenti batteri:

Tabella 2: matrice acqua: batteri investigati

<i>Parametri indagati</i>	<i>Tecnica d'indagine</i>	<i>Unità di misura</i>
<i>Escherichia coli</i>	Filtrazione su membrana secondo ISO 9308-1:2002	UFC/100 ml
Enterococchi	Filtrazione su membrana secondo ISO 7899-1:2002	UFC/100 ml
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Filtrazione su membrana secondo UNI-EN 12780:2002	UFC/100 ml
Coliformi a 37 °C e 44 °C	Filtrazione su membrana secondo ISO 9308-1:2002	UFC/100 ml
Conta psicrofila a 22°C	Inclusione secondo UNI-EN-ISO 6222:2001	UFC/ml
Conta mesofila a 37°C	Inclusione secondo UNI-EN-ISO 6222:2001	UFC/ml
Stafilococchi patogeni	Filtrazione su membrana secondo UNI 10678:1998	UFC/100 ml
<i>Aeromonas spp</i>	Filtrazione su membrana su Agar CAB	UFC/100 ml

2.4.2. Alimenti

Anche per i campioni alimentari si è seguito un protocollo di campionamento che ha previsto, alla stregua dei campioni di acqua, un prelievo asettico, per prevenire una contaminazione esterna. Tutti i campioni prelevati sono stati etichettati in modo chiaro con tutte le indicazioni necessarie alla sua identificazione, quali la data, l'ora del campionamento e la tipologia; sono state trasmesse, con il campione, tutte le indicazioni concernenti le eventuali determinazioni effettuate in loco e qualunque altra informazione che poteva risultare utile nell'interpretazione dei risultati di laboratorio.

L'esame batteriologico relativo alle matrici alimentari ha seguito le linee relative ai parametri microbiologici previsti dalla delibera della Direzione Generale Sanità della Regione Lombardia e le metodiche utilizzate sono quelle indicate dall'Istituto Superiore della Sanità (De Medicis D. et al., 1996).

Le verdure sono state acquistate presso gli stessi contadini che utilizzano l'acqua a scopo irriguo e sono state identificate con le sigle V1, V2 e V3.

Una volta giunti in laboratorio si è proceduto al peso in un contenitore sterile (busta sterile per Stomacher o vaso per mixer) di una massa m del campione di almeno 10 g. A tale quantità si è addizionato a temperatura appropriata, il diluente in misura pari (in ml) a $9 \cdot m$. Lo Stomacher è stato utilizzato per uno o due minuti. Per ogni parametro si è proceduto come segue:

Tabella 3: matrice alimenti: batteri investigati

<i>Parametri indagati</i>	<i>Tecnica d'indagine</i>	<i>Unità di misura</i>
<i>Escherichia coli</i>	Numerazione mediante MPN	MPN/g
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Inclusione con pour-plate technique con PAB	UFC/g
Coliformi a 30°C	Numerazione mediante MPN	MPN/g
Coliformi fecali a 44°C	Numerazione mediante MPN	MPN/g
<i>Salmonella spp</i>	4 fasi distinte secondo ISTISAN	UFC/25 g
Conta mesofila a 30°C	Inclusione con pour-plate technique con PCA	UFC/g
Stafilococchi patogeni	Conteggio su terreno solido con BP	UFC/g
<i>Aeromonas spp</i>	Inclusione con pour-plate technique con CAB	UFC/g

2.4.3. Indagini cliniche

Le indagini cliniche sono state condotte su campioni di coprocultura, urinocoltura e tamponi faringei isolati da 25 pazienti anonimi, di età compresa tra i 50 e gli 80 anni, sia di sesso maschile che femminile, prelevati da un laboratorio privato del Comune di Candida (AV). Per ognuno di essi sono stati ricercati gli stessi batteri isolati dalle matrici acqua ed alimenti, attraverso test di ossidasi, catalasi, coagulasi e prove biochimiche (API 20 E, API 20NE, Bio Merieux).

2.4.4. PCR

La tecnica della reazione a catena della DNA polimerasi fu inventata da Kary Mullis alla metà degli anni '80 e, analogamente alla sequenziamento del DNA, ha rivoluzionato la genetica molecolare. La tecnica della reazione a catena della polimerasi, si avvale della Taq DNA polimerasi e di inneschi di oligonucleotidi complementari ai due estremi 3' del segmento duplex che deve essere amplificato.

L'obiettivo che la tecnica della PCR si prefigge è quello di copiare la sequenza di ciascun filamento nel tratto compreso tra le due regioni a cui si associano per annealing gli inneschi oligonucleotidici. Quindi, dopo aver fatto associare i primer al DNA denaturato che contiene il segmento da amplificare, si procede con l'estensione degli inneschi mediante la DNA polimerasi e quattro dideossinucleotidi trifosfato (dNTP). I DNA duplici che risultano da questo processo sono poi denaturati e riassociati con gli inneschi e la reazione con la DNA polimerasi viene ripetuta. Questo ciclo di reazioni (denaturazione-annealing e sintesi) può essere ripetuto fino a 30 volte. Ad ogni ciclo la quantità del segmento di DNA duplice raddoppia, poiché sia le molecole di DNA sintetizzate ex novo sia quelle già esistenti si associano agli inneschi e vengono copiate. Tutti i ceppi isolati dalle tre matrici (acqua, alimenti ed uomo) sono stati isolati con le tecniche convenzionali, in modo da ottenere ceppi puri.

Per effettuare questa procedura, è stata inizialmente creata una miscela composta da:

- ❑ una colonia pura immersa in Buffer PCR,
- ❑ due oligonucleotidi specifici, nel nostro caso, per il 16S RNA.
- ❑ Taq polimerasi.
- ❑ dNTP
- ❑ $MgCl_2$
- ❑ H_2O fino a 50 ml.

La miscela, così composta, è stata incubata a 95°C per 5 minuti. Dopo di ciò sono stati effettuati trenta cicli, ognuno dei quali costituito da tre fasi.

La prima fase ha avuto inizio riscaldando la miscela fino a raggiungere una temperatura che provocava la denaturazione del DNA (95°C x 30'').

Nella seconda fase è stato effettuato un abbassamento rapido della temperatura, fino ad un livello tale da permettere l'annealing degli inneschi (55°C x 30'').

Nella terza fase la temperatura è stata regolata in modo da far avvenire la sintesi del DNA.

Il secondo ciclo e quelli successivi hanno tutti inizio con il riscaldamento fino a raggiungere la temperatura di denaturazione.

L'utilizzo della Taq polimerasi comporta un forte vantaggio, infatti, non solo è resistente al calore, ma presenta un'attività maggiore a temperature comprese tra 70°C e 75°C.

Per sequenziare il DNA, è stato usato come stampo una catena singola e i nuovi filamenti sono stati estesi a partire dal gruppo 3'-ossidrilico sul primer, utilizzando come substrati deossiribonucleosidi trifosfato (Tripathy S. e al., 2007, Schmalenberger, A. et al, 2001, Sanger F., 1981, Gilbert W., 1982).

Il processo è stato effettuato in quattro distinte reazioni di copiatura, ciascuna delle quali ha determinato la produzione di una collezione di filamenti che terminavano rispettivamente sui residui A, G, C, o T. Le interruzioni sono state provocate dall'incorporazione di un residuo dideossinucleotidico che, mancante di un gruppo 3'-ossidrilico, ha bloccato l'ulteriore estensione della catena.

Sono così stati allestiti quattro tubi. Contenenti rispettivamente ddA, ddG, ddC, ddT.

I prodotti delle quattro reazioni sono stati sottoposti ad elettroforesi su gel di poliacrilammide in condizioni denaturanti. In questo modo è stata ottenuta una buona risoluzione di singole catene polinucleotidiche che differivano per un solo residuo nucleotidico. L'isotopo radioattivo, ³⁵S, ha permesso di visualizzare le catene mediante autoradiografie su pellicole sensibili ai raggi X. Tutte e quattro le collezioni, che costituivano l'insieme derivato da un singolo frammento di

DNA, sono state sottoposte ad elettroforesi simultanea in corsie parallele su uno stesso gel. In fase di lettura, analizzando corsia per corsia, è stata ricavata l'intera sequenza.

CAPITOLO 3

3.1. Risultati e discussione dei risultati

La campagna di monitoraggio delle acque sorgive relative ai punti definiti S1, S2 e S3 è stata condotta con una cadenza che ha permesso di effettuare, per ogni stazione, un totale di 24 determinazioni, 6 per ogni stagione.

Tutti i dati sono stati trattati statisticamente considerando la funzione *confidenza* con un valore di alfa 0,05 che restituisce una significatività del 95%.

Di seguito sono riportati i valori medi ottenuti da tutte le rilevanze analitiche, senza distinzione stagionale, in quanto non intervengono differenze significative.

3.1.1. Matrice acqua – Sorgente S1 (lavatoio comunale)

Dall'analisi dei dati è possibile trarre alcune indicazioni:

tutti i parametri microbiologici forniscono valori che superano abbondantemente i limiti imposti dal D.Lgs. 31/2001 per l'utilizzo a scopo diretto, sia per quanto concerne i soli parametri indicatori (allegato I parte A), che per quelli di routine (allegato II tabella A).

Ma per quanto concerne l'uso a scopo irriguo e per quanto attiene ai parametri e ai limiti dettati dalla classificazione di Giardini et al. (1993), i valori ricadono nella classe I.

I dati medi ottenuti, con i relativi limiti di confidenza al 95%, sono mostrati in tabella 4.

Tabella 4: sorgente S1

Parametro	U.M	Valori S1	Limiti di confidenza	D.lgs. 31/01	Classificazione di Giardini et al., 1993		
					Classe I	Classe II	Classe III
CBT 37 °C	UFC/ml	$1,7 \cdot 10^4$	$\pm 8,1 \cdot 10^2$	-	-	-	-
CBT 22 °C	UFC/ml	$2,3 \cdot 10^4$	$\pm 7,4 \cdot 10^2$	Senza variaz.anomale	-	-	-
Coliformi totali	UFC/100 ml	$1,2 \cdot 10^3$	$\pm 7,1 \cdot 10^1$	0	< 5000	5000 -12000	> 12000
Coliformi fecali	UFC/100 ml	$5,5 \cdot 10^2$	$\pm 4,4 \cdot 10^1$	-	< 1000	1000 -12000	> 12000
<i>Escherichia coli</i>	UFC/100 ml	$1,1 \cdot 10^2$	$\pm 0,6 \cdot 10^1$	0	-	-	-
Enterococchi	UFC/100 ml	$2,2 \cdot 10^2$	$\pm 4,1 \cdot 10^1$	0	<1000	1000 -2000	>2000
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	UFC/100 ml	$2,0 \cdot 10^2$	$\pm 2,2 \cdot 10^1$	Assenza	-	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	UFC/100 ml	$1,4 \cdot 10^2$	$\pm 0,4 \cdot 10^1$	Assenza	-	-	-
<i>Aeromonas spp</i>	UFC/100 ml	$9,0 \cdot 10^2$	$\pm 1,1 \cdot 10^1$	-	-	-	-

3.1.2. Matrice acqua – Sorgente S2 (acqua d’alice)

Anche per la seconda sorgente monitorata valgono le stesse indicazioni tratte per la sorgente 1: tutti i parametri microbiologici forniscono valori che superano i limiti imposti dal D.Lgs. 31/2001 per l’utilizzo a scopo diretto, sia per quanto concerne i soli parametri indicatori (allegato I parte A), che per quelli di routine (allegato II tabella A).

Ma per quanto concerne l’uso a scopo irriguo e per quanto attiene ai parametri e ai limiti dettati dalla classificazione di Giardini et al. (1993), anche questi valori ricadono nella classe I.

I dati medi ottenuti, con i relativi limiti di confidenza al 95%, sono mostrati in tabella 2.

Tabella 5: sorgente S2

Parametro	U.M	Valori S2	Limiti di confidenza	D.lgs. 31/01	Classificazione di Giardini et al., 1993		
					Classe I	Classe II	Classe III
CBT 37 °C	UFC/ml	$1,0 \cdot 10^4$	$\pm 7,9 \cdot 10^2$	-	-	-	-
CBT 22 °C	UFC/ml	$2,1 \cdot 10^4$	$\pm 6,4 \cdot 10^2$	Senza variaz.anomale	-	-	-
Coliformi totali	UFC/100 ml	$2,8 \cdot 10^3$	$\pm 7,6 \cdot 10^1$	0	< 5000	5000 -12000	> 12000
Coliformi fecali	UFC/100 ml	$6,5 \cdot 10^2$	$\pm 6,7 \cdot 10^1$	-	< 1000	1000 -12000	> 12000
<i>Escherichia coli</i>	UFC/100 ml	$1,0 \cdot 10^2$	$\pm 1,4 \cdot 10^1$	0	-	-	-
Enterococchi	UFC/100 ml	$4,2 \cdot 10^2$	$\pm 5,3 \cdot 10^1$	0	<1000	1000 -2000	>2000
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	UFC/100 ml	$1,7 \cdot 10^2$	$\pm 2,3 \cdot 10^1$	Assenza	-	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	UFC/100 ml	$1,7 \cdot 10^2$	$\pm 0,5 \cdot 10^1$	Assenza	-	-	-
<i>Aeromonas spp</i>	UFC/100 ml	$9,7 \cdot 10^2$	$\pm 1,2 \cdot 10^1$	-	-	-	-

3.1.3. Matrice acqua – Sorgente S3 (peschiera)

Anche per la terza sorgente monitorata valgono le stesse indicazioni tratte per la sorgente 1: tutti i parametri microbiologici forniscono valori che superano i limiti imposti dal D.Lgs. 31/2001 per l'utilizzo a scopo diretto, sia per quanto concerne i soli parametri indicatori (allegato I parte A), che per quelli di routine (allegato II tabella A).

Ma per quanto concerne l'uso a scopo irriguo e per quanto attiene ai parametri e ai limiti dettati dalla classificazione di Giardini et al. (1993), anche questi valori ricadono nella classe I.

I dati medi ottenuti, con i relativi limiti di confidenza al 95%, sono mostrati in tabella 2.

Tabella 6: sorgente S3

Parametro	U.M	Valori S3	Limiti di confidenza	D.lgs. 31/01	Classificazione di Giardini et al., 1993		
					Classe I	Classe II	Classe III
CBT 37 °C	UFC/ml	$1,6 \cdot 10^4$	$\pm 7,6 \cdot 10^2$	-	-	-	-
CBT 22 °C	UFC/ml	$3,1 \cdot 10^4$	$\pm 6,9 \cdot 10^2$	Senza variaz.anomale	-	-	-
Coliformi totali	UFC/100 ml	$1,9 \cdot 10^3$	$\pm 8,8 \cdot 10^1$	0	< 5000	5000 -12000	> 12000
Coliformi fecali	UFC/100 ml	$3,2 \cdot 10^2$	$\pm 6,9 \cdot 10^1$	-	< 1000	1000 -12000	> 12000
<i>Escherichia coli</i>	UFC/100 ml	$1,0 \cdot 10^2$	$\pm 1,3 \cdot 10^1$	0	-	-	-
Enterococchi	UFC/100 ml	$7,6 \cdot 10^2$	$\pm 8,0 \cdot 10^1$	0	<1000	1000 -2000	>2000
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	UFC/100 ml	$1,2 \cdot 10^2$	$\pm 1,3 \cdot 10^1$	Assenza	-	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	UFC/100 ml	$2,2 \cdot 10^2$	$\pm 1,4 \cdot 10^1$	Assenza	-	-	-
<i>Aeromonas spp</i>	UFC/100 ml	$1,5 \cdot 10^3$	$\pm 3,9 \cdot 10^1$	-	-	-	-

3.1.4. Matrice acqua – Sinottico

Dal quadro sinottico è possibile mettere in evidenza che la contaminazione è diffusa in tutti e tre i punti monitorati, con una concentrazione media che non mostra differenze statisticamente significative.

Tabella 7: sinottico

Parametro	U.M	Sorgente S1	Limiti di confidenza	Sorgente S2	Limiti di confidenza	Sorgente S3	Limiti di confidenza
CBT 37 °C	UFC/ml	$1,7 \cdot 10^4$	$\pm 8,1 \cdot 10^2$	$1,0 \cdot 10^4$	$\pm 7,9 \cdot 10^2$	$1,6 \cdot 10^4$	$\pm 7,6 \cdot 10^2$
CBT 22 °C	UFC/ml	$2,3 \cdot 10^4$	$\pm 7,4 \cdot 10^2$	$2,1 \cdot 10^4$	$\pm 6,4 \cdot 10^2$	$3,1 \cdot 10^4$	$\pm 6,9 \cdot 10^2$
Coliformi totali	UFC/100 ml	$1,2 \cdot 10^3$	$\pm 7,1 \cdot 10^1$	$2,8 \cdot 10^3$	$\pm 7,6 \cdot 10^1$	$1,9 \cdot 10^3$	$\pm 8,8 \cdot 10^1$
Coliformi fecali	UFC/100 ml	$5,5 \cdot 10^2$	$\pm 4,4 \cdot 10^1$	$6,5 \cdot 10^2$	$\pm 6,7 \cdot 10^1$	$3,2 \cdot 10^2$	$\pm 6,9 \cdot 10^1$
<i>Escherichia coli</i>	UFC/100 ml	$1,1 \cdot 10^2$	$\pm 0,6 \cdot 10^1$	$1,0 \cdot 10^2$	$\pm 1,4 \cdot 10^1$	$1,0 \cdot 10^2$	$\pm 1,3 \cdot 10^1$
Enterococchi	UFC/100 ml	$2,2 \cdot 10^2$	$\pm 4,1 \cdot 10^1$	$4,2 \cdot 10^2$	$\pm 5,3 \cdot 10^1$	$7,6 \cdot 10^2$	$\pm 8,0 \cdot 10^1$
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	UFC/100 ml	$2,0 \cdot 10^2$	$\pm 2,2 \cdot 10^1$	$1,7 \cdot 10^2$	$\pm 2,3 \cdot 10^1$	$1,2 \cdot 10^2$	$\pm 1,3 \cdot 10^1$
<i>Staphylococcus aureus</i>	UFC/100 ml	$1,4 \cdot 10^2$	$\pm 0,4 \cdot 10^1$	$1,7 \cdot 10^2$	$\pm 0,5 \cdot 10^1$	$2,2 \cdot 10^2$	$\pm 1,4 \cdot 10^1$
<i>Aeromonas spp</i>	UFC/100 ml	$9,0 \cdot 10^2$	$\pm 1,1 \cdot 10^1$	$9,7 \cdot 10^2$	$\pm 1,2 \cdot 10^1$	$1,5 \cdot 10^3$	$\pm 3,9 \cdot 10^1$

Grafico 1: andamento indicatori (secondo classificazione Giardini et al 1993)

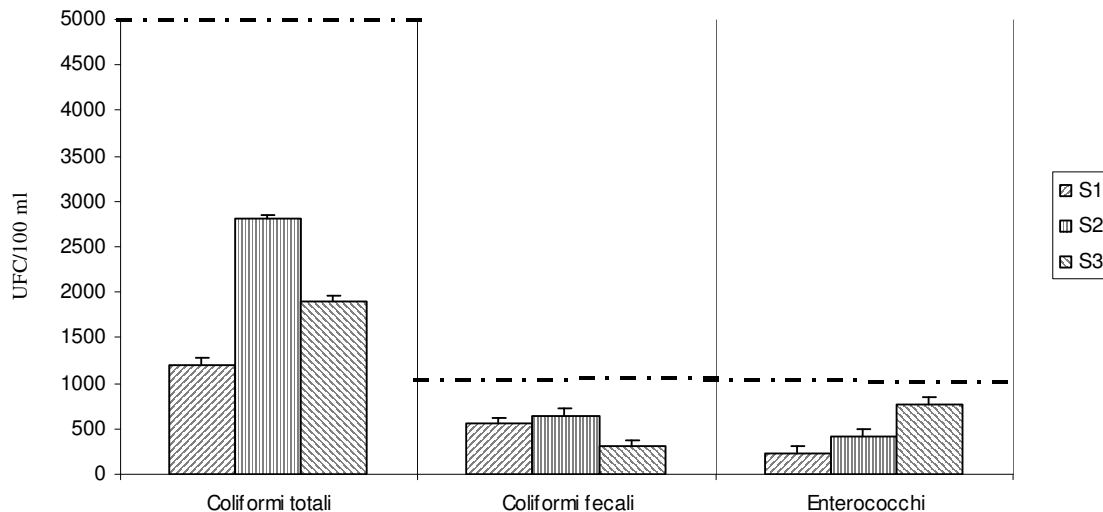


Grafico 2: andamento indicatori (secondo d.lgs 31/2001)

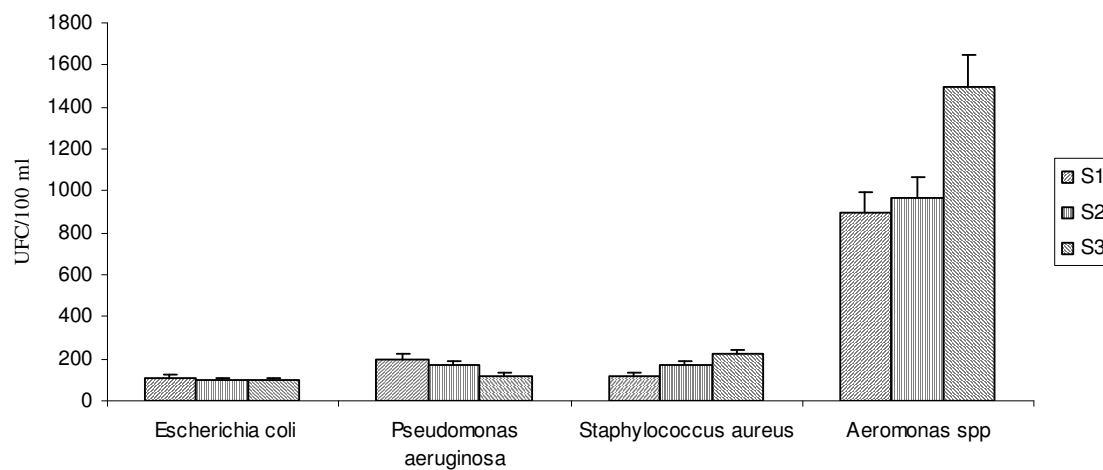
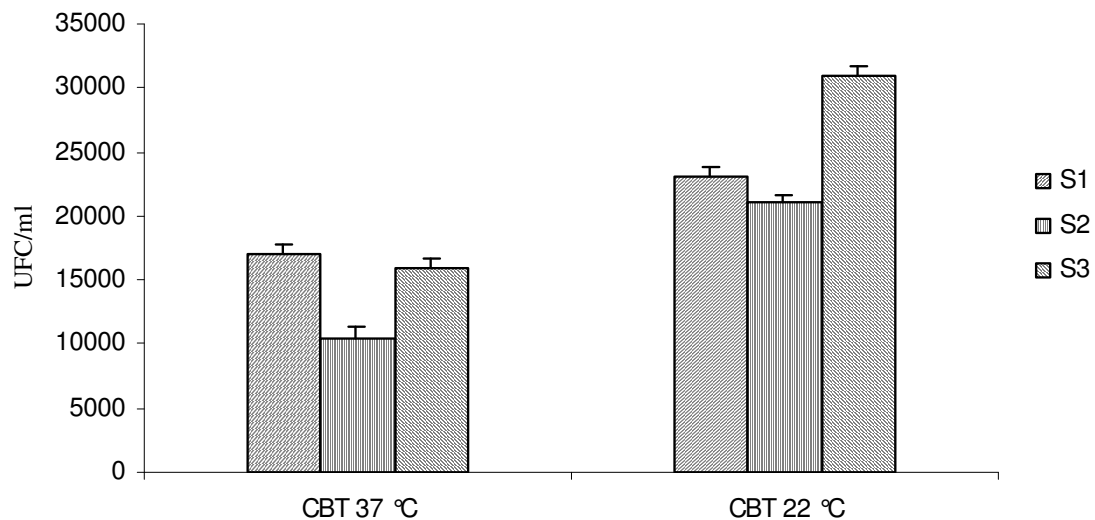


Grafico 3: andamento CBT 37 °C e 22 ° (secondo d.lgs 31/2001)



3.1.5. Alimenti

La campagna di monitoraggio è continuata effettuando analisi su alimenti (verdure da consumarsi crude) acquistati presso gli stessi contadini che utilizzano l'acqua a scopo irriguo. La scelta dei parametri è stata dettata dalla necessità di ottenere un dato relativo alla qualità igienico –sanitaria dei prodotti (secondo le indicazioni della delibera n° 1120 del 06/07/2005 della Regione Umbria e del Decreto ministeriale della Repubblica Francese del 22/03/1993.)

Nella scelta dei parametri, naturalmente, sono stati inseriti anche i batteri isolati dalle analisi sulle acque sorgive.

Le analisi sono state condotte con una cadenza che ha permesso di effettuare, per ogni stazione, un totale di 12 determinazioni, 3 per ogni stagione.

Tutti i dati sono stati trattati statisticamente considerando la funzione *confidenza* con un valore di alfa 0,05 che restituisce una significatività del 95%.

Di seguito sono riportati i valori medi ottenuti da tutte le rilevazioni analitiche, senza distinzione stagionale, in quanto non intervengono differenze significative.

Tabella 8: alimenti

Parametro	U.M	V1	Limiti di confidenza	V2	Limiti di confidenza	V3	Limiti di confidenza	Del. 1120 – Regione Umbria	D. Min. Francese 22/02/93
CBT 30 °C	UFC/g	$2,8 \cdot 10^5$	$\pm 5,1 \cdot 10^3$	$1,3 \cdot 10^5$	$\pm 3,9 \cdot 10^3$	$3,4 \cdot 10^5$	$\pm 6,4 \cdot 10^3$	$1,0 \cdot 10^6$	$5,0 \cdot 10^6$
Coliformi a 30 °C	MPN/g	$1,1 \cdot 10^2$	$\pm 1,0 \cdot 10^1$	$7,8 \cdot 10^2$	$\pm 1,6 \cdot 10^1$	$5,9 \cdot 10^2$	$\pm 2,5 \cdot 10^1$	$1,1 \cdot 10^3$	-
Coliformi a 44 °C	MPN/g	15	$\pm 0,6 \cdot 10^1$	25	$\pm 0,4 \cdot 10^1$	50	$\pm 0,7 \cdot 10^1$	-	-
<i>Escherichia coli</i>	MPN/g	4	$\pm 0,4 \cdot 10^1$	5	$\pm 0,3 \cdot 10^1$	8	$\pm 0,4 \cdot 10^1$	$1,0 \cdot 10^2$	10^2
<i>Salmonella spp</i>	UFC/25 g	Assente	-	Assente	-	Assente	-	Assente	Assente
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	UFC/g	5	$\pm 0,1 \cdot 10^1$	Assente	$\pm 0,2 \cdot 10^1$	Assente	$\pm 0,3 \cdot 10^1$	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	UFC/g	Assente	-	Assente	-	Assente	-	$1,0 \cdot 10^2$	-
<i>Aeromonas spp</i>	UFC/g	10	$\pm 0,2 \cdot 10^1$	25	$\pm 0,3 \cdot 10^1$	40	$\pm 1,2 \cdot 10^1$	-	-

Per quanto attiene ai limiti esistenti, tutti gli alimenti analizzati hanno mostrato valori che rientrano in quelli imposti da entrambe le direttive di riferimento, fornendo indicazioni positive sulle loro caratteristiche igienico-sanitarie.

Mai sono stati isolati patogeni quali *Salmonella* e *Staphylococcus aureus*. Sono stati altresì ritrovati batteri, come *Pseudomonas aeruginosa* (sebbene in basse concentrazioni), isolati anche nelle acque sorgive.

Grafico 4: andamento CBT 30 ° (secondo D.R. 1120/2005)

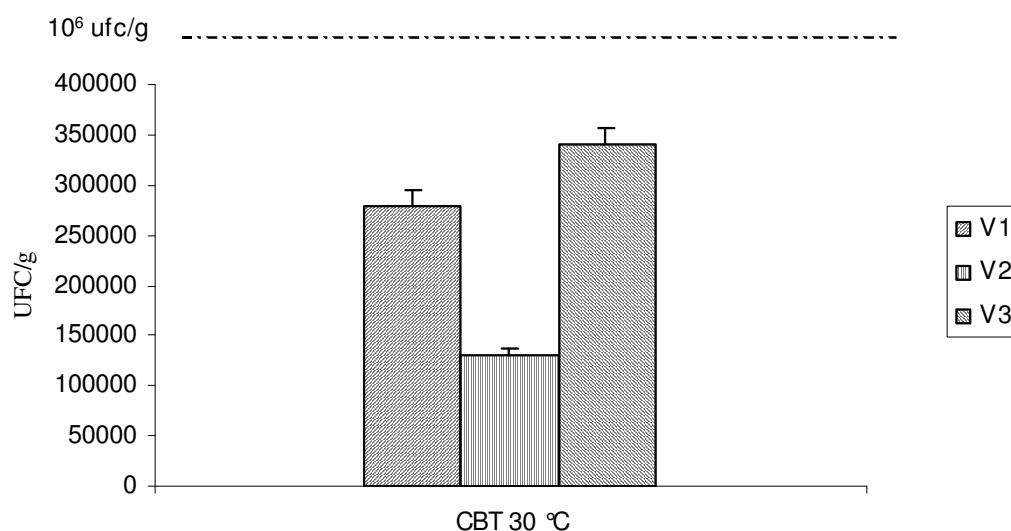
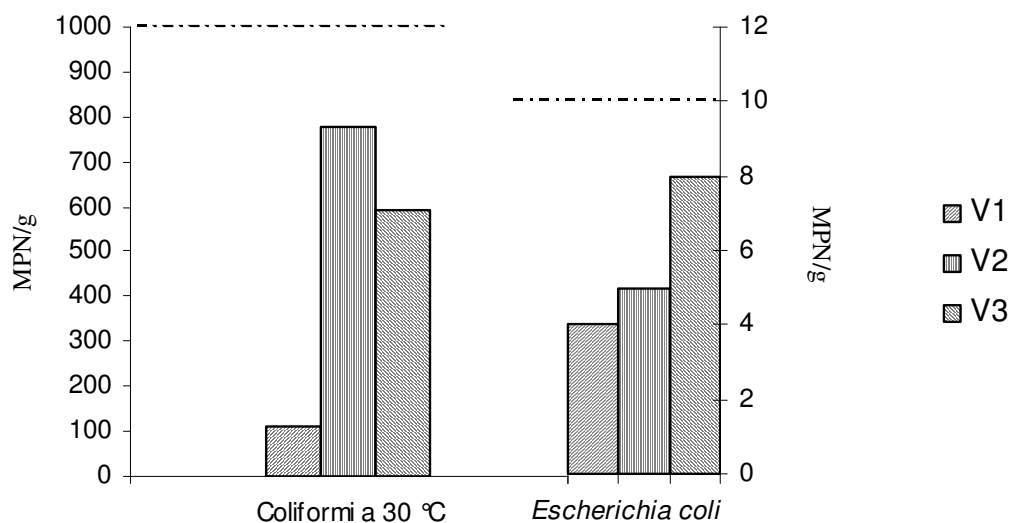


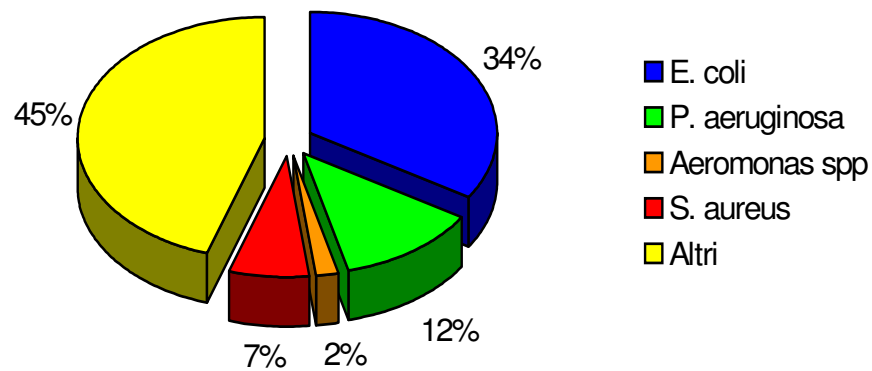
Grafico 5: andamento indicatori (secondo D.R. 1120/2005)



3.1.6. Indagini cliniche

Dai 25 campioni derivanti da urinocoltura, coprocultura e tamponi faringei sono stati isolati alcuni ceppi batterici appartenenti alle specie *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* e *Aeromonas pneumophila* ritrovati con percentuali di presenza diverse.

Grafico 6: Frequenze dei batteri isolati



3.1.7. PCR

Dalle analisi effettuate attraverso la PCR è stata riscontrata una significativa differenza tra i ceppi di *Escherichia coli* e *Aeromonas spp* isolate nei tre siti di indagine e quelli isolati dalle analisi cliniche. Per quanto riguarda *Pseudomonas aeruginosa* lo stesso discorso può essere esteso alle sorgenti S2 ed S3 ed i rispettivi prodotti vegetali. Invece i ceppi isolati nelle acque sorgive e negli alimenti sono risultate uguali per la sorgente S1 e alimenti V1. Le sequenze ottenute sono riportate di seguito:

***Pseudomonas aeruginosa* strain BHP7-6 16S**
 ribosomal
 RNA gene, partial sequence
 Length = 1453
 Score = 920 bits (464), Expect = 0.0
 Identities = 464/464 (**100%**)
 Strand = Plus / Plus

```
Query: 14  acacatgcaagtcgagcggatgaagggagcttgctcctggattcagcgcgacgggtga 73
          |||
Sbjct: 23  acacatgcaagtcgagcggatgaagggagcttgctcctggattcagcgcgacgggtga 82
```

```
Query: 74  gtaatgcctaggaatctgcctgtagtggggataacgtccgaaacggcgctaatacc 133
          |||
Sbjct: 83  gtaatgcctaggaatctgcctgtagtggggataacgtccgaaacggcgctaatacc 142
```

```
Query: 134 gcatacgtcctgaggagaaagtggggatcttcggacctcacgctatcagatgagccta 193
          |||
Sbjct: 143 gcatacgtcctgaggagaaagtggggatcttcggacctcacgctatcagatgagccta 202
```

```
Query: 194  ggtcggattagctagtgtggggtaaaggcctaccaaggcgacgatccgtaactgtct 253
          |||
Sbjct: 203  ggtcggattagctagtgtggggtaaaggcctaccaaggcgacgatccgtaactgtct 262
```

```
Query: 254  gagaggatgatcagtcacactggaactgagacacgggtccagactcctacggaggcagca 313
          |||
Sbjct: 263  gagaggatgatcagtcacactggaactgagacacgggtccagactcctacggaggcagca 322
```

```
Query: 314  gtggggaatattggacaatgggcgaaagcctgatccagccatgccgcgtgtgtgaagaag 373
          |||
Sbjct: 323  gtggggaatattggacaatgggcgaaagcctgatccagccatgccgcgtgtgtgaagaag 382
```

```
Query: 374 gtcttcggattgtaaagcactttaagttgggaggaagggcagtaagttaataccttgctg 433
      |||
Sbjct: 383 gtcttcggattgtaaagcactttaagttgggaggaagggcagtaagttaataccttgctg 442
```

```
Query: 434 ttttgacgttaccaacagaataagcaccggctaacttcgtgccca 477
      |||
Sbjct: 443 ttttgacgttaccaacagaataagcaccggctaacttcgtgccca 486
```

Allineamento con BlastN della sequenza del gene 16S della colonia isolata dalla sorgente S1 su piastre di *Pseudomonas* agar base.

***Pseudomonas aeruginosa* strain ATCC 27853 16S**
ribosomal RNA gene,
partial sequence
Length = 1466
Score = 852 bits (430), Expect = 0.0
Identities = 437/438 (**99%**), Gaps = 1/438 (0%)
Strand = Plus / Plus

```
Query: 9  ctgtctcctggtattcagcgcgacgggtgagtaatgcctaggaatctgcctggtagtg 68
      |||
Sbjct: 55  ctgtctcctgg-attcagcgcgacgggtgagtaatgcctaggaatctgcctggtagtg 113
```

```
Query: 69  ggggataacgtccggaacggcgctaataccgcatacgtcctgagggagaaagtggggg 128
      |||
Sbjct: 114 ggggataacgtccggaacggcgctaataccgcatacgtcctgagggagaaagtggggg 173
```

```
Query: 129 atcttcggacctcagctatcagatgagcctaggtcggttagctagttggtgggtaaa 188
      |||
Sbjct: 174 atcttcggacctcagctatcagatgagcctaggtcggttagctagttggtgggtaaa 233
```

```
Query: 189 ggctaccaaggcgacgatccgtaactggtctgagaggatgatcagtcacactggaactg 248
      |||
Sbjct: 234 ggctaccaaggcgacgatccgtaactggtctgagaggatgatcagtcacactggaactg 293
```

```
Query: 249 agacacggtccagactcctacgggagggcagcagtggggaatattggacaatgggcgaaag 308
      |||
Sbjct: 294 agacacggtccagactcctacgggagggcagcagtggggaatattggacaatgggcgaaag 353
```

```
Query: 309 cctgatccagccatgccgcgtgtgtgaagaaggctctcgattgtaaagcactttaagtt 368
      |||
Sbjct: 354 cctgatccagccatgccgcgtgtgtgaagaaggctctcgattgtaaagcactttaagtt 413
```

```
Query: 369 gggaggaagggcagtaagttaataccttgctgttttgacgttaccaacagaataagcacc 428
      |||
Sbjct: 414 gggaggaagggcagtaagttaataccttgctgttttgacgttaccaacagaataagcacc 473
```



```
Query: 429 ggctaacttcgtgccagc 446
          |||
Sbjct: 474 ggctaacttcgtgccagc 491
```

Allineamento con BlastN della sequenza del gene 16S della colonia isolata dall'alimento V1 su piastre di Pseudomonas Agar Base.

L'identificazione termina a questo punto, in quanto i ceppi isolati dalle indagini cliniche mostrano differenze significative, le cui specifiche non vengono evidenziate.

CAPITOLO 4

4.1. Conclusioni e strategie di prevenzione

Alla luce di quanto emerso da questo lavoro è possibile trarre alcune indicative conclusioni.

In primo luogo è stato possibile definire che la qualità della falda idrica superficiale, oggetto di questo studio non rispetta le indicazioni imposte dal D.lgs. 31/2001, ma rientra abbondantemente, per quanto attiene ai limiti microbiologici dettati dalla classificazione di Giardini et al. (1993), nella I classe di qualità, per l'utilizzo a scopi irrigui. Ciononostante, il monitoraggio di determinati indicatori di contaminazione ambientale e fecale ha permesso, attraverso identificazione PCR, di tracciarne il percorso, accertando la veicolazione lungo la filiera acqua-alimenti, di batteri appartenenti alla specie *Pseudomonas aeruginosa*. Sebbene non sia stato possibile isolare gli stessi ceppi dalle indagini cliniche, il rischio di un possibile contagio per l'uomo non è trascurabile (Fothergill JL et al., 2007, Scott FW et al., 2004).

Questo aspetto evidenzia che, nonostante sia chiara la necessità di introduzione di limiti normativi certi e rigidi per la definizione dell'acqua destinata all'irrigazione, è necessario non minimizzare il rischio per la salute dell'uomo, soprattutto nella prospettiva di una concretizzazione del ciclo integrato delle acque. (Mara DD. et al. 2007, Carr RM et al., 2007, Petterson SR et. al., 2001).

A tale riguardo, va comunque evidenziato che la cosiddetta “Legge Merli” prevedeva, per le acque depurate, standard (per quelle regioni che li ha imposti - tab. 11 dell'*Appendice* -) talmente restrittivi da farli risultare addirittura più bassi delle concentrazioni normalmente rilevate nei corpi idrici superficiali, nonché di quelli idonei alla balneazione.

Pertanto, questo limite, va segnalato, poteva essere ottenuto solo ricorrendo a trattamenti depurativi molto spinti (e molto costosi), rendendo di fatto inapplicabile il ricorso all'uso delle

acque reflue depurate per l'irrigazione. Stessa situazione per quanto riguarda il riutilizzo dei reflui in agricoltura negli altri paesi comunitari ed extracomunitari (Stati Uniti, Israele, Tunisia, Spagna, ecc.) nonostante gli studi condotti (OMS, 1989; EPA, 1992; Nurizzo et al., 1987, ecc.) dimostrino range di tolleranza più elevati.

Infine, sebbene i prodotti vegetali rispettino le indicazioni delle normative cogenti, soprattutto per la continua assenza dei patogeni monitorati, la presenza costante dei batteri indicatori ne amplifica la potenziale pericolosità, anche in vista del possibile incremento nel consumo dei cosiddetti prodotti *minimally processed* o prodotti di IV gamma.

Da questi dati ottenuti, appare, dunque, necessario ed auspicabile, sia il censimento dei siti di captazione di acque destinate all'irrigazione, per conoscere in che misura e in quale modo viene utilizzata la risorsa idrica, sia l'aumento dei controlli per la valutazione dell'efficacia dei processi disinfezione di dette acque.

Gli interventi di prevenzione dovrebbero basarsi sul controllo dei rischi di contaminazione e sulla presenza di un trattamento adeguato al tipo di risorsa, cioè in grado di eliminare o abbattere i contaminanti microbiologici specifici di quella risorsa.

In altri termini è fondamentale, per garantire la sicurezza, conoscere a fondo le caratteristiche della risorsa e i rischi, sia costanti che accidentali, di inquinamento ai quali questa può essere soggetta.

Se sono numerosi, infatti, i sistemi di trattamento delle acque che tendono ad abbattere la carica microbica potenzialmente dannosa per la salute dell'uomo, è fortemente sentita l'esigenza di utilizzare nuovi sistemi che prevedano l'uso di più tecniche contemporaneamente.

Da queste considerazioni emerge l'importanza di utilizzare un criterio preventivo per il controllo dei rischi associati all'utilizzo delle acque.

Questo approccio infatti permetterebbe:

- di essere “preventivo piuttosto che reattivo”;
- di imparare dalle esperienze passate;

- di investire risorse proporzionali al rischio presente

In altri termini è necessario creare un ponte tra le conoscenze derivanti dal monitoraggio ambientale (*Risk Assessment*) al fine di attuare le opere di prevenzione e mitigazione (*Risk Management*), in modo da introdurre una metodologia logica e sistematica che consenta, attraverso step successivi, di identificare, valutare, comunicare, eliminare e monitorare i rischi associati a qualsiasi attività, che deve poi essere promossa con una “cultura del rischio” fondata sulla convinzione che gli errori rappresentano, se adeguatamente analizzati, preziose opportunità di apprendimento e di miglioramento (Hrudey SE et al, 2006, O’Connor DR, 2002).

Bibliografia

1. **Allen MJ., Edberg SC., Reasoner DJ.** “Heterotrophic plate count bacteria: what is their significance in drinking water?”. *International Journal of Food Microbiology* 92: 265-77 – 2004 –
2. **APHA, AWWA, WEF,** *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater* Washington, DC n. 8: 43 - 46. – 1995
3. **Aquino S, Esposito V., Aquino AM., Fabbrocino S.,** “Idrogeologia del massiccio carbonatico Terminio-Tuoro (Campania)”. Consorzio Interprovinciale Alto Calore – 2001
4. **Araujo M., Sueiro RA., Gomez MJ., Garido MJ.** “*Enumeration of Clostridium perfringens spores in groundwater samples: comparison of six culture media*”. *Journal of Microb. Methods* 57:175-180 - 2004 -
5. **Asano T., Cotruvo JA.,** “Groundwater recharge with reclaimed municipal wastewater:health and regulatory considerations” - *Water Research* 38 1941–1951 - 2004
6. **Asano T., Levine A.** “Wastewater reclamation, recycling and reuse:past, present and future”. *Wat. Sci Technol* 33 (10-11):1-14 - 1996 -
7. **Ashbolt N.J.** “*Microbial contamination of drinking water and disease outcomes in developing region*”s *Toxicology* 198 229–238 - 2004 -
8. **Ashbolt N.J., Grabow WOK., Snozzi M.** “Indicators of microbial water quality”. In: Fewtrell L., Bartram J. (eds). *Water Quality: guidelines, standards and health. Risk assessment and management for water-related infectious disease.* IWA Publishing, London (Chapter 13): 289-315 – 2001 –
9. **Aulicino A., Volterra L.** “Microbiologia delle acque di diversa derivazione” - Istituto Superiore di Sanità, n° 14 - 2004 -
10. **Aulicino F., Oliveri R., Orsini P., Carere M., Costanzo L., Alongi A., Oliveri F., Purpari G.** “The influence of treated sewages on microbiological quality of seawater”. *Ann Ig.,* 13, 25-29 - 2001
11. **Baghel V.S., Gopal K., Dwivedi S., Tripathi R. D.** Bacterial indicator of fecal contamination of the Gangetic river system rigth at its source. *Ecological Indicators* 5: 49-56 2005 –
12. **Baker MN** “*The quest for pure water. The history of water purification; from the earliest econds to the twentieth century*”. Aufl. Denver, CO, USA: American Water Works Associations – 1981 -

13. **Balkwill DL, Ghiorse WC.** “Characterization of subsurface bacteria associated with two shallow aquifers in Oklahoma”. *Appl Environm Microbiol*;50:580-8. – 1985-
14. **Barry-Ryan, C., O’Beirne, D.,** “Effects of peeling methods on the quality of ready-to-use carrot slices”. *Int. J. Food Sci. Technol.* 35, 243–254 – 2000 –
15. **Bennik, M.H.J., Vorstman,W., Smid, E.J., Gorris, L.G.M.** “The influence of oxygen and carbon dioxide on the growth of prevalent *Enterobacteriaceae* and *Pseudomonas* species isolated from fresh and controlled-atmospherestored vegetables”. *Food Microbiol.* 15, 459–469 - 1998 –
16. **Beuchat LR** “Ecological factors influencing survival and growth of human pathogens on raw fruits and vegetables”. *Microbes and Infection* 4: 413-423 – 2002 -
17. **Beuchat LR, Ryu JH.** “Produce handling and processing practices”. *Emerg. Infect. Dis.* 3:459-465 – 1997
18. **Blake DM, Maness PC, Huang Z, Wolfrum EJ, Huang J, Jacoby WA.** “*Application of the photocatalytic chemistry of titanium dioxide to disinfection and the killing of cancer cells*”. *Sep. Purif. Meth.* 28 1–50 - 1999 -
19. **Block SS, Seng VP, Goswami DY.** “*Chemically enhanced sunlight for killing bacteria*”. *J. Solar Energy Eng.* 119, 85–91 – 1997 -
20. **Block SS.** “*Chlorine and chlorine compounds*”, pp. 135 in *Disinfection, Sterilization, and Preservation*, edited by Lea and Febiger. Malvern, Pennsylvania – 1991 -
21. **Bonadonna L., Briancesco R.,** La giornata mondiale dell’acqua. *Notiziario Istisan* Vol 20 n° 5 maggio 2007
22. **Bouwer H.** “Groundwater hydrology” New York, NY, USA: McGraw-Hill Book Co; 1978.
23. **Brackett, R.E.** “Incidence, contributing factors, and control of bacterial pathogens in produce”. *Postharvest Biol. Technol.* 15, 305–311 – 1999 -
24. **Burnett SL., Beuchat LR.** “Foodborne pathogens –human pathogens associated with raw produce and unpasteurized juice, and difficulties indecontamination”. *Journal of industrial microbiology & biotechnology.* 27:104-110 – 2001 –
25. **Calderon RL., Mood EW.** “Bacterial colonizing point-of-use, granular actived carbon filters and their relationship to human health”. *US EPA CR-813978-01-0* – 1991
26. **Caliandro A. ,** Problemi agronomici dell’irrigazione nel Mezzogiorno, in *Accademia nazionale di agricoltura – CNR - , Problematiche dell’agricoltura italiana. Scenari possibili*, Bologna, 2001.

27. **Carr RM, Blumenthal UJ, Mara DD.** “ Guidelines for the safe use of wastewater in agriculture: revisiting WHO guidelines“. *Water Sci Technol* 50(2): 31-8 – 2004-
28. **Carraro E., Bonetta S., Palombo F., Gilli G.,** “Rischio microbiologico associato al consumo di acqua potabile nei paesi industrializzati” - *Ann Ist Super Sanità*;40(1):117-140 – 2004 –
29. **Cerbini G., Gorla M.,** *Idrogeologia applicata – Principi, metodi e misure – Ed. Geo-graph Segrate - 2004*
30. **Chapelle FH, Morris JT, McMahon PB, Zelibor JL.** “Bacterial metabolism and the composition of ground water, Floridian aquifer, South Carolina”. *Geology* 16:117-21 – 1988 -
31. **Chapelle FH.** “Microorganisms present in the ground-water environment. “Ground water microbiology and geochemistry”. New York: J Wiley and Sons; p. 32-57 – 2001 -
32. **Chastre J., Trouillet JL.** “Problem pathogen (*Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter*)”. *Semin Respir. Infect.* 15 : 287-298 – 2000 –
33. **Cinnerella S., Buttafuoco G., Pirrone N.** “Stochastic analysis to assess to spatial distribution of groundwater nitrate concentration in the Po catchment (Italy)”. *Environ. Poll.* 133: 569-580 – 2005 –
34. **Civita M.** “Idrogeologia del massiccio carbonatico Terminio-Tuoro (Campania)”. *Mem. e note Ist. Geol. Appl.* 11 –Napoli – 1969
35. **Conroy RM, Elmore-Meegan, M, Joyce TM, McGuigan J, Barnes J.** “*Solar disinfection of drinking water and incidence of diarrhoea in maasai children: a controlled field trial*”. *The Lancet* 348, 1695–1697 - 1996 -
36. **Cooper AT, Goswami DY, Block SS.** “*Simultaneous Detoxification and Disinfection of Water by Solar Photocatalytic Treatment*”, *Solar Engineering* 1997. In: *Proceedings of the ASME International Solar Energy Conference*, Washington, DC, April - 1997 -
37. **Cooper AT, Goswami DY.** “*A Survey of Solar Based Drinking Water Treatment*”, *Solar Engineering* 1998, In: *Proceedings of the ASME International Solar Energy Conference*, Albuquerque, New Mexico, June 1998, pp. 265–275 - 1998a -
38. **Cooper AT, Goswami DY.** “*Evaluation of Solar Photosensitization of Benzene, Toluene and Escherichia coli with Methylene Blue and Rose Bengal*” *Renewable and Advanced Energy Systems for the 21st Century*. In: *Proceedings of the 1999 ASME Conference*, Maui, Hawaii, April - 1999 -
39. **Cooper AT, Goswami DY.** “*Solar photochemical detoxification and disinfection for water treatment in tropical developing countries*”. *J. Adv. Oxid. Technol.* 3 (2): 151–154 - 1998b
40. **Coppola L., Cotecchia V., Lattanzio M., Salvemini A., Tavolini T.** “Il gruppo di sorgenti di Cassano Irpino (Avellino-Italia meridionale): regime idrogeologico ed analisi strutturale del bacino di alimentazione.” *Ist. Geol. Appl.* 24 – Bari – 1990

41. **D.Lgs 11 maggio 1999 n. 152.** Disposizione sulla tutela delle acque dall'inquinamento e recepimento delle direttive 91/271/CEE concernente il trattamento delle acque reflue urbane e della direttiva 91/676/CEE relativa alla protezione dai nitrati provenienti da fonti agricole (G.U. 124, 29/5/999, suppl. ord. n.101/L.)
42. **D.lgs. del 2 febbraio 2001 n° 31** (attuazione della Direttiva 98/83/CE relativa alla qualità delle acque destinate al consumo umano pubblicato sulla GU n°52 del 03/03/2001 – suppl. Ordinario n° 41)
43. **D.lgs. del 3 aprile 2006 n° 152** (norme in materia ambientale pubblicato sulla GU n° 88 del 14/04/2006)
44. **Davies CM., Long JAH., Donald M., Ashbolt NJ.** “Survival of fecal microorganism in marine e freshwater sediments”. Appl. Environ., Microbiol. 61:1888-1896 – 1995 –
45. **De Castro O., Gianguzzi L., Colombo P., De Luca P., Marino G., Guida M.** “*Multivariate Analysis of Sites Using Water Invertebrates and Land use as Indicators of the Quality of Biotopes of Mediterranean Relic Plant (Petagnaea gussonei, Apiaceae)*” Volume 2, Issue 3 pages 161-171 – 2007 -
46. **De Medicis D., Fenicia L., Orefice I.E., Stacchini A.:** “Metodi di analisi utilizzati per il controllo microbiologico degli alimenti. Istituto Superiore di Sanità, n° 4 II suppl. –1996
47. **Delaquis P., Bach S., Dinu LD.,** “Behavior of Escherichia coli O157:H7 in leafy vegetables”. J Food Prot. Aug;70(8):1966-74 – 2007-
48. **Deliberazione della Giunta Regionale Umbria - n°1120 del 06/07/2005** “Sicurezza alimentare: norme vincolanti regione Umbria – aggiornamento DGR n°5310/1994: particolari tipologie di alimenti e modalità d’analisi. Determinazioni.
49. **Della Casa R.** “Le nuove Frontiere dei prodotti orticoli”. L’Informatore Agrario n° 27 – 2003 –
50. **Demirel Z., Külege K.** “Monitoring of spatial and temporal hydrochemical changes in groundwater under the contaminating effects of anthropogenic activities in Mersin region,Turkey”. Env. Monit. Assess. 101:129-145 - 2005 –
51. **Dimola S., Caruso M.L.,** Helicobacter pylori in animals affecting the human habitat through the food chain. Res. 1999 Sep-Oct;19(5B):3889-94
52. **Direzione generale Sanità Regione Lombardia** — Metodi raccomandati per analisi microbiologiche non normate di alimenti – 2002 -
53. **Doller PC, Dietrich K, Filipp N, Brockmann S, Dreweck C, Vonthein R, Wagner-Wiening C, Wiedenmann A.** “Cyclosporiasis outbreak in Germany associated with the consumption of salad” .Emerg Infect Dis;8:992-4 – 2002 –
54. **Dussart L., Dupont JP., Zimmerlin I., Lacroix M., Saiter JM., Junter GA., Jouenne T.,** “*Occurrence of sessile Pseudomonas oryzihabitans from a karstified chalk aquifer*” Water Res. 37: 1593–1600 - 2003 -

55. **Edwards DR., Daniel TC.** “Environmental impacts of on-farm poultry waste disposal – a review”.
Bioresource Technol. 41:9:33 – 1992-
56. **Egli T, Koster W, Meile L.** Pathogenic microbes in water and food: changes and challenges. FEMS
Microbiol Rev 26:111-2 – 2002 -
57. **EPA, EN:** Technical Support Document For Water Quality - based toxics Control. Office of Water
Enforcement and Permits, Office of Water Regulation and Standards - 1991
58. **EPA, Environmental Protection Agency,** A Methods for measuring the Acute toxicity of effluents and
Receiving Waters to freshwater and marine organism (fourth Edition). Environmental Monitoring System
Laboratory – 1991
59. **EPA, Environment Protection Agency .** Guidelines for water reuse - 1992 -
60. **EPA, U.S. Environmental Protection Agency,** Center for Environmental Research Information,
Cincinnati, Ohio. EPA/625/R-92/004,
61. **European Environment Agency. Krinner W.** Sustainable water use in Europe. Part 1. Sectoral use of
water. Copenhagen: 1999 (Environmental Assessment Report No. 1).
62. **Everis, L.** “Risks of pathogens in ready-to-eat fruits, vegetables, and salads through the production
process”. Review No. 44. Gloucestershire, Campden & Chorleywood Food Research Association Group –
2004 -
63. **Farolfi S., Brusaporci M. ,** Agroindustria, ambiente e territorio, F. Angeli, Milano, 2002.
64. **Fernández MC., Giampaolo BN., Ibañez SB., Guagliardo MV., Esnaola MM., Conca L., Valdivia P.,
Stagnaro SM., H. Frade CC.** “*Aeromonas hydrophila* and its relation with drinking water indicators of
microbiological quality in Argentina” Genetica 108:35-40 – 2000 -
65. **Ficco P, Rifici R, Santoloci M.** “La nuova tutela delle acque” Edizioni Ambiente, Milano –1999 –
66. **Finch GR, Belosevic M** “Controlling *Giardia* spp. and *Cryptosporidium* spp. In drinking waste by
microbial reduction processes”. Can. J. Civ Eng 28:67-80 - 2001 -
67. **Fothergill JL., Upton AL., Pitt TL., Hart CA., Winstanley C.** “Diagnostic multiplex PCR assay for the
identification of the Liverpool, Midlands 1 and Manchester CF epidemic strains of *Pseudomonas*
aeruginosa” Journal of Cystic Fibrosis - in press – 2007 -
68. **Francis GA, Thomas C, O’Beirne D.** “The microbiological safety of minimally processed vegetables”.
Int. J. Food Sci. Technol. 34, 1–22.
69. **Seymour IJ, Appleton H.** “Foodborne viruses and fresh produce”. J. Appl. Microbiol. 91, 759–773 – 1999

70. **Fröder H, Martins CG, De Souza KL, Landgraf M, Franco BD, Destro MT.** “Minimally processed vegetable salads: microbial quality evaluation” J Food Prot. Aug; 70(5):1277-80 – 2007 –
71. **Gale P.** Developments in microbiological risk assessment for drinking water. J Appl Microbiol;91:191-205 – 2001 -
72. **Gallay A, De Valk H, Cournot M, Ladeuil B, Hemery C, Castor C, Bon F, Mégraud F, Le Cann P, Desenclos JC; Outbreak Investigation Team** “A large multi-pathogen waterborne community outbreak linked to faecal contamination of a groundwater system, France, 2000 - Clin Microbiol Infect. Jun;12(6):561-70 – 2006
73. **Giardini L., Borin M., Gigolo U.,** La qualità delle acque per l’irrigazione; Ed. L’informatore agrario - 1993 –
74. **Gilbert W.** “DNA sequencing and gene structure”. Science (214):1305 – 1982 –
75. **Goswami, DY.** “A review of engineering developments of aqueous phase solar photocatalytic detoxification and disinfection processes”. J. Solar Energy Eng. 119 (2): 101–107 - 1997 -
76. **Grobe S, Wingender J, Flemming HC.** “Capability of mucoid *Pseudomonas aeruginosa* to survive in chlorinated water”. Int J Hyg Environ Health 204 (2-3):139-42 – 2001 -
77. **Guida M., Inglese M., D’Auria G., Mattei ML., Marino G.,** “Caratterizzazione igienistica delle acque del fiume Sarno”. Acqua & Territorio n°13-14 – 2007 –
78. **Guida M., Scherillo S., Inglese M., Marino G.:** “*Valutazione dello stato di qualità del bacino del fiume Tusciano*”, pp215-217. Atti del Convegno PETIT OSA - Piattaforme Evolute di Telecomunicazioni e di Information Technology per l’offerta di servizi al settore Ambientale - 04 giugno 2007
79. **Guida M., Marino G., Buonaguro R., Melluso G.:** “*Microbiological monitoring in the public catering sector*” – ” Ital. J. Food Sci. n. 2 vol. 18 (219- 226) – 2006
80. **Guida M., Lubrano G., Marino G., Melluso G:** “*Variazioni microbiche nel latte fresco pastorizzato dopo interruzione della catena del freddo* ” – *Industrie Alimentari* – XLIII 497-502 – 2004 -
81. **Guida M., Marino G., Melluso G.:** “*Problematiche igienistiche relative alla shelf-life del latte UHT*” — *Industrie Alimentari* – XLII 712-716 – 2003 -
82. **Gullotti A., Valentino L., Oliveti R., Casaccio A., Mantia L., Marinaro L., Pedalino B., Purpali G., Tramuto F., Torregrossa M.V.** “Valutazioni igienico-sanitarie delle acque di tre invasi artificiali della provincia di Palermo destinate al consumo umano”. Igiene Moderna, 110, 1-29 – 1998 -
83. **Hambidge A.** “*Reviewing efficacy of alternative water treatment techniques*”. Health Estate 55 (6): 23–25 - 2001 -

84. **Hamilton A.J.**, Stagnitti F., Premier R., Boland AM., Hale G., “Quantitative microbial risk assessment models for consumption of raw vegetables irrigated with reclaimed water”. *Appl. Environ. Microbiol.* 72(5): 3284-90 – 2006 –
85. **Hamilton A.J., Stagnitti FS, Premier R, Boland AM.** “Is the risk of illness through consuming vegetables irrigated with reclaimed wastewater different for different population groups?” *Water Sci Technol* 54(11-12): 379-86 - 2006
86. **Havelaar A.H., M. During, Versteegh J.F.M.**. Ampicillin-dextrin agar medium for the enumeration of *Aeromonas* species in water by membrane filtration. *Journal Applied Bacteriology*, 62: 279-287 – 1987 -
87. **Havelaar A.H., Vonk M.** The preparation of Ampicillin dextrin agar for the enumeration of *Aeromonas* in water. *Letters in Applied. Microbiology*, 7: 169-171. – 1988 -
88. **Hedberg CW., McDonald KL., Osterholm MT.** “Changing emidemiology of foodborne diseases : a Minnesota perspective“. *Clin. Infect. Dis.* 18: 671-682 – 1994 –
89. **Hellard ME., Stewart MI., Forbes AB., Fairley CK.** “A randomized, blinded, controlled trial investigation of gastrointestinal health effects of drinking water quality”. *Envirom., Health Perspect.* 109(8): 773-78 – 2001 –
90. **Hrudey SE, Hrudey EJ, Pollard SJT.** “Risk management for assuring safe drinking water”. *Enviromental International* 32: 948-957 – 2006 -
91. **Hussain M, Rasool SA, Khan MT, Wajid A.** “Enterococci vs coliforms as a possible fecal contamination indicator: baseline data for Karachi”. *Pak J Pharm Sci.* Apr;20(2):107-11 – 2007 -
92. **INEA** “I principali criteri di classificazione di qualità dei corpi idrici superficiali e delle acque utilizzate in ambito agricolo” – Quaderni Irrigazione - 2000
93. **IRSA (CNR).** Metodi analitici per le acque. Quaderno n. 100. Roma: Istituto Poligrafico e Zecca dello Stato Ed., 1994.
94. **ISMEA** “Rapporto sui consumi alimentari in Italia – 2005
95. **Karapinar M., Gonul S.A.** Survival of *Yersinia enterocolitica* and *Escherichia coli* in spring water. *Int J Food Microbiol* 13(4): 315–9 - 1991 -
96. **Ko WC, Chiang SR., Yan JJ., Chuang YC.** “Comparative pathogenicity of bacteraemic isolates of *Aeromonas hydrophila* and *Klebsiella pneumoniae*”. *Clin. Microbial. Infect.* 11(7): 553-58 – 2005 -
97. **Krapac I.G., Dey W.S., Roy W.R., Smyth C.A., Storment E., Sargent S.L., Steele J.D.** “Impacts of swine manure pits on groundwater quality”. *Environ. Pollution* 120: 475-492 – 2002 -

98. **Kühn KP, Chaberny IF, Massholder K, Stickler M, Benz WV, Sonntag H, Erdinger L.** “*Disinfection of surfaces by photocatalytic oxidation with titanium dioxide and UVA light*”. Chemosphere 53:71-77 - 2003 -
99. **Leclerc H.** “Relationship between common water bacteria and pathogens in drinking water”. In: Bartram J, Cotruvo J, Exner M, Fricker C, Glasmacher A (Ed.). Heterotrophic Plate Counts and Drinking-water Safety. London: IWA Publishing; p. 80-118 – 2003 -
100. **Legge 18 maggio 1989** n. 183/89
101. **Legge 5 gennaio 1994** n. 36/94
102. **Liming SH, Baghwat AA.** “Application of a molecular beacon—real-time PCR technology to detect Salmonella species contaminating fruits and vegetables”. International Journal of Food Microbiology 95 177– 187 – 2004 -
103. **Lund BM.** “Ecosystems in vegetable foods”. J.Appl. Bacteriol. 73, S115–S126 – 1992 -
104. **Mallin MA.** “Impact of industrial-scale swine and poultry production on rives and estuaries”. American Scientist 88:26-37 – 2000 –
105. **Mara DD, Sleigh PA, Blumenthal UJ, Carr RM.** “Health risks in wastewater irrigation: comparing estimates from quantitative microbial risk analyses and epidemiological studies”. J Water Health Mar; 5(1): 39-50 – 2007 -
106. **Marchetti R, Galassi S, Provini S.** Ecologia Applicata. Città studi Ed. Torino - 1998
107. **McMahon MAS, Wilson IG.** ”The occurence of enteric pathogens and Aeromonas species in organic vegetables”. Int J Food Microbiol. ; 70:155-162 – 2001 -
108. **Metodi analitici per le acque** - Volume terzo, Istituto Ricerca Sulle Acque, Consiglio Nazionale delle Ricerche. Ed. La Pergamena, Roma, 1973.
109. **Nguyen C, Carlin F.** “The microbiology of minimally processed fresh fruits and vegetables”. Crit. Rev. Food Sci. Nutr. 34, 371–401 – 1994 –
110. **Nurizzo C., Vismara R., Butelli P., Mezzanotte V.** Trattamenti di affinamento di liquami civili depurati, per il reimpiego irriguo in agricoltura. Quaderno di Ingegneria Ambientale – 1987 -
111. **Nwachuku N, Charles P.** “Microbial risk assessment : don’t forget the children“. Current Opin. Microbiol. 7: 206-209 – 2004 –
112. **O’Connor DR** “ Report of Walkerton Inquiry: part 2. A strategy for safe water” Toronto Canada. The Walkerton Inquiry – 2002 -

113. **Payment P., Franco E., Richardson L., Siemiatychi J.** “*Gastrointestinal health effects associated with the consumption of drinking water producer by point-of-use domestic reverse-osmosis filtration units*”. Journal of Applied and Environmental Microbiology 57 : 945-948 – 1991 -
114. **Payment P., Franco E.** “*Clostridium Perfringens and somatic coliphages as indicators of the efficiency of drinking water treatment for viruses and protozoan cysts.*” Appl. Environ. Microbiol. 59: 2418-2424 – 1993
115. **Payment P., Hunter P.R.**, “Endemic and epidemic infectious intestinal disease and its relationship to drinking water” Fewtrell L, Bartram J (Ed.). *Water quality: guidelines, standard and health*. London: IWA Publishing WHO; 2001. p. 61-8.
116. **Petterson SR, Ashbolt NJ, Sharma A.** “Microbial risks from wastewater irrigation of salad crops: a screening-level risk assessment” -Water Environ Res.- Nov-Dec; 73(6):667-72 – 2001 -
117. **Picchi A., Borrelli L.**, L’acqua a meta’ del guado “la seconda fase del Q.C.S. 2000-2006 e l’applicazione della direttiva quadro 2000/60/CE” - Matera, 30 gennaio 2004 - "La Direttiva quadro e la sfida nel settore agricolo" Regione BASILICATA Conferenza Permanente dei presidenti delle Regioni e delle Province Autonome
118. **Pozzoli R., Chiodo F.** "Laboratorio clinico di analisi microbiologiche". S.E.F. ED., Milano:. 51 – 53 – 1981 -
119. **Ragaert P., Devlieghere F., Debevere J.** “Role of microbiological and physiological spoilage mechanisms during storage of minimally processed vegetables” Postharvest Biol. Technol. 44: 185-194 – 2007 –
120. **Rai PK, Tripathi BD.**” Microbial contamination in vegetables due to irrigation with partially treated municipal wastewater in a tropical city”. Int J Environ Health Res Oct;17(5):389-95 – 2007 -
121. **Raisanen S., Ruuskaneen L., and Nyman S.**: “Epidemic ascariasis-evidence of transmission by imported vegetables”. Scand.J.Prim Helth Care 3: 189-191 – 1985 –
122. **Reasoner DR.**, “Monitoring heterotrophic bacteria in potable water”. In: Mc Feters GA (eds). Drinking water microbiology: progress and recent developments. Springer-Verlag, NY: 452-477 – 1990 –
123. **Regione Emilia Romagna** Relazione aggiuntiva del Piano di Ristrutturazione degli impianti di depurazione costieri. – 1987 -
124. **Regione Puglia** Delibera n. 1648 della Giunta Regionale del 5 marzo – 1984 -
125. **Regolamento (CE) n° 2073/2005 del 15/11/05 sui criteri applicabili ai prodotti alimentari** – pubblicato sulla GUCE n° 338 del 22.12.2005
126. **Ricciardi R., Ebraico R., Mungiguerra M., Pompella A., Ricciardi AM.** “Studio dei microrganismi isolati presso il P.O. “Moscati” di Aversa ASL 2” – Biologi Italiani: settembre 2007 (8): pp 86-88 – 2007 -

127. **Salih FM.** “Enhancement of solar inactivation of *Escherichia coli* by titanium dioxide photocatalytic oxidation”. J. Appl. Microbiol. 92 (5): 920–926 - 2002 -
128. **Sanger F.** “Determination of nucleotide sequences in DNA“. Science (214):1205 - 1981
129. **Scalfaro C., Delibato E., Orefice L.,** “Metodi di ricerca di batteri patogeni negli alimenti”. Industrie Alimentari XLIII 1257-1280 – 2004 –
130. **Schmalenberger, A., Schwieger, F., Tebee, C.C.** “Effect of primers hybridizing to different evolutionarily conserved regions of the small subunit rRNA gene in PCR based microbial community analyses and genetic profiling”. Appl. Environ. Microbiol. 67, 3557–3563 – 2001 –
131. **Scott FW, Pitt TL.** “Identification and characterization of transmissible *Pseudomonas aeruginosa* strains in cystic fibrosis patients in England and Wales”. J Med Microbiol;53:609–15 – 2004 -
132. **Semproni M., Bonadonna L.** Metodo per la ricerca e l’isolamento di *Aeromonas sp* in acque destinate al consumo umano. Notiziario dei Metodi Analitici, IRSA-CNR, luglio: 11-15 – 1997 -
133. **Shaffter N., Parriaux A.** “Pathogenic-bacterial water contamination in mountainous catchments”. Water Res. 36:131-139 – 2002 –
134. **Shannon KE., Lee DY., Trevors JT., Beaudette LA.** “Application of real-time quantitative PCR for the detection of selected bacterial pathogens during municipal wastewater treatment” Science of the Total Environment 382 121–129 – 2007 -
135. **Shirvastava R., Upreti RK., Jain SR., Prasad KN., Seth PK., Chaturvedia UC.** “Suboptimal chlorine treatment in drinking water leads to selection of multi-drug resistant: *Pseudomonas aeruginosa*”. Ecotoxil. and environ Safety 58:277-283 – 2004 –
136. **Sivapalasingam S, Friedman CR, Cohen L, Tauxe RV.** “Fresh produce: a growing cause of outbreaks of foodborne illness in the United States, 1973 through 1997”. J. Food Prot. 67, 2342–2353 – 2004 -
137. **SNEATH P.H.A.** "Bergey’s Manual of Systematic Bacteriology". William and Wilkins Co., Baltimore, Md, Vol. 2.: 1003 - 1019. –1996 -
138. **Steele M, Mahdi A, Odumeru J.** “Microbial assessment of irrigation water used for production of fruit and vegetables in Ontario, Canada”. J Food Prot. 68 (7): 1388-92 - 2005
139. **Steele M, Odumeru J.** “Irrigation water as source of foodborne pathogens on fruit and vegetables” J Food Prot. 67 (12): 2839-49 – 2004 -
140. **Stine SW, Song I, Choi CY, Gerba CP.** “Application of microbial risk assessment to the development of standards for enteric pathogens in water used to irrigate fresh produce” J Food Prot. 68 (5): 913-8 – 2005 -

141. **Surveillance of waterborne disease outbreak-United States**, 1997-1998. MMWR Surveillance summaries;49 (SS04):1-35 – 2000 -
142. **Surveillance of waterborne disease outbreak-United States**, 1999-2000. MMWR Surveillance summaries;51(SS-08):1-28 – 2002 -
143. **Swerdlow DL, Woodruff BA, Brady RC, Griffin PM, Tippen S, Donnell JrHD, Geldreich EE, Payne BJ, Meyer Jr A, Wells JG, Greene KD, Bright M, Bean NH, Blake PA.** “A waterborne outbreak in Missouri of *Escherichia coli* O157:H7 associated with bloody diarrhoea and death”. *Ann Intern Med*;117:812-20 – 1992 -
144. **Tauxe R.** “Emerging foodborne pathogens”. *Int J Food Microb.*; 78:31-41 – 2002 -
145. **Todd DK.** “Groundwater hydrology, 2nd ed.” New York NY, USA: Wiley; 1980.
146. **Toivonen PMA., De El JR.** “Physiology of fresh-cut and vegetables“ in : Lamikanra O. (ed) *Fresh-cut fruits and vegetables. Science, Technology and Market.* CRC Press Florida USA – 2002
147. **Tripathy S., Kumar N., Mohanty S., Samanta M., Mandal RN., Maiti NK.** “Characterisation of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from freshwater culture systems” *Microbiological Research* 162 391-396 - 2007 -
148. **Tyrrel SF, Knox JW, Weatherhead EK..** “Microbiological water quality requirements for salad irrigation in the United Kingdom” *J Food Prot.* Aug;69(8):2029-35 – 2006 –
149. **United Nations.** *Water, a shared responsibility. The United Nations World Water Development Report - 2.* UNESCO and Berghahn Books, Paris and London: 2006.
150. **Vankerschaver, K, Willocx F, Smout C, Hendrickx M, Tobback P.** “The influence of temperature and gas mixtures on the growth of the intrinsic micro-organisms on cut endive: predictive versus actual growth”. *Food Microbiol.* 13, 427–440 – 1996 -
151. **Vidal A, Diaz AI, El Hraiki A, Romero M, Muguruza I, Senhaji F, Gonzalez J.** “*Solar photocatalysis for detoxification and disinfection of contaminated water: pilot plant studies*”. *Catal. Today* 54. 283–290 - 1999 -
152. **Vidal A, Diaz AI.** “*High-performance, low-cost solar collectors for disinfection of contaminated water*”. *Water Environ. Res.* 72: 271–276 - 2000 -
153. **Volterra L.** “L’inquinamento microbiologico delle acque di falda. Acque di falda: stato dell’arte delle conoscenze in Italia”(Rapporti ISTISAN 99/32) – 2000 –
154. **Watada A, Ko NP., Minott DA.** “Factors affecting quality of fresh-cut horticultural products” *Postharvest Biology and Technology.* Vol 9 pp:115 – 125 – 1996 –
155. **WHO.** *Guidelines for drinking-water quality.* Geneva: WHO Ed. Recommendations. 2004.

156. **WHO.** Water, Sanitation and Hygiene links to Health. Geneva: WHO Ed.. 2004.
157. **WINN JR.** - Testo atlante di microbiologia diagnostica. II Ed. Delfino editore, Roma, 1995.
158. **Zicari G.** “Gestione della sicurezza alimentare” (Ed, Esselibri Simone) – 2003-

Appendice

Tabella 9: Riferimenti legislativi: D. lgs 31/2001 parametri microbiologici: verifica e di routine

Parametro	U.M.	Valore limite	
<i>Escherichia coli</i>	UFC/100 ml	0	R
Enterococchi	UFC/100 ml	0	V
Batteri coliformi a 37 °C	UFC/100 ml	0	R
<i>Pseudomonas auruginosa</i>	UFC/250 ml	Assenza	R
<i>Staphylococcus aureus</i>	UFC/250 ml	Assenza	V
Conteggio delle colonie a 22 °C	UFC/ml	Senza variazioni anomale	R

Tabella 10: Limiti di accettabilità per i parametri microbiologici fondamentali del gruppo B della classificazione proposta da Giardini et al., 1993

Parametro	U.M.	Classe I	Classe II	Classe III
Coliformi Totali	MPN/100 ml	<5000	5000-12000	>12000
Coliformi fecali	MPN/100 ml	<1000	1000-12000	>12000
Streptococchi fecali	MPN/100 ml	<1000	1000-2000	>2000

Tabella 11: Parametri di qualità delle acque reflue da utilizzare a scopo irriguo emanate dalle Regione Emilia Romagna, Puglia e Sicilia

Parametro	U.M.	Emilia Romagna	Puglia	Sicilia
Coliformi Totali	MPN/100 ml	-	-	3000
Coliformi fecali	MPN/100 ml	12	2	1000
Streptococchi fecali	MPN/100 ml	-	-	-
<i>Salmonella spp</i>	N°/5 L	-	Assenza	Assenza

Tabella 12: Parametri di qualità delle acque reflue da utilizzare a scopo irriguo emanate da alcuni Enti internazionali, stati americani ed europei

Parametro	U.M.	Coliformi fecali
OMS (1973)	MPN/100 ml	100
OMS (1985)	MPN/100 ml	1000
OMS (1987)	MPN/100 ml	<1000
EPA (1992)	MPN/100 ml	1000
Stato della California (1975)	MPN/100 ml	2
Stato di Washington	MPN/100 ml	2
Stato dell'Arizona	MPN/100 ml	2
Stato dello Utah	MPN/100 ml	3
Spagna (Andalusia) 1994	MPN/100 ml	<1000
Italia (Legge Merli 319/76)	MPN/100 ml	2

Tabella 13: DGR Umbria n° 1120 del 06/07/2005 e Decreto ministeriale della Repubblica Francese del 22/03/1993

Parametro	U.M.	DGR Umbria	D.M. francese			
			n	c	m	M
Carica Mesofila Totale	UFC/g	$1,0 \bullet 10^6$	5	2	$5,0 \bullet 10^5$	$5,0 \bullet 10^6$
Coliformi Totali	MPN/g	$1,1 \bullet 10^3$	-	-	-	-
<i>Escherichia coli</i>	MPN/g	$1,0 \bullet 10^2$	5	2	10	$1,0 \bullet 10^2$
<i>Staphylococcus aureus</i>	MPN/g	$1,0 \bullet 10^2$	-	-	-	-
<i>Salmonella spp</i>	N°/25 g	Assenza	Assenza			